

Charakterisierung eines neuen monoklonalen  
Antikörpers gegen den humanen  
Somatostatin-Rezeptor 5

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Anna Hunder**

**geboren am 14.10.1988 in Erfurt**

**Gutachter**

1. Frau Prof. Dr. Amelie Lupp, Jena
2. Frau PD Dr. Brigitte Kaiser, Jena
3. Frau PD Dr. Jutta Merkord, Rostock

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 19.12.2013

## Abkürzungsverzeichnis

ACL	Adenylatcyclase
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
AK	Antikörper
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATPase	Adenosintriphosphatase
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
C-Terminus	Carboxy-terminales Ende eines Proteins
Cy3	Indocarbocyanin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	European Medicines Agency
GEP	gastroenteropankreatisch
GEP-NET	gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumor
GH	Growth Hormone, Wachstumshormon
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> -Protein	inhibitorisches G-Protein
HAT-Medium	Selektionsmedium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält
HEK-Zellen	humane embryonale Nieren-Zellen
hSSTR	humaner Somatostatin-Rezeptor
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IRS	immunoreaktiver Score
kDA	Kilodalton
LAR	long acting release, Arzneimittel mit verzögerter Freigabe
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein-Kinase
max.	Maximalwert
MG	Molekulargewicht

min.	Minimalwert
MMP	Magermilchpulver
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTS	Metastase
NET	neuroendokriner Tumor
N-Terminus	Amino-terminales Ende eines Proteins
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET/CT	Positronen-Emissions-Tomographie kombiniert mit Computertomographie
PRRT	peptidrezeptorvermittelte Radiotherapie
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SS-14	Somatostatin-14
SS-28	Somatostatin-28
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UFC	urinary free cortisol, freies Kortisol im Urin
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WGA	Weizenkeimagglutinin

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Somatostatin	3
2.1.1	Funktion von Somatostatin	4
2.2	Somatostatin-Rezeptoren	5
2.2.1	Aufbau und Struktur	5
2.2.2	Signaltransduktion	6
2.2.3	Vorkommen	8
2.2.3.1	Somatostatin-Rezeptor-Subtypen in Tumoren	8
2.3	Somatostatin-Analoga	10
2.3.1	Octreotid	10
2.3.1.1	Indikationen	11
2.3.1.2	Nebenwirkungen	12
2.3.2	Pasireotid	13
2.3.2.1	Indikation	13
2.3.2.2	Mögliche weitere Indikationen	14
2.3.2.3	Nebenwirkungen	14
2.3.3	Bindungsaffinität zu den Somatostatin-Rezeptor-Subtypen	14
2.4	Antikörper	15
2.4.1	Herstellung monoklonaler Antikörper	17
2.4.2	In der vorliegenden Arbeit verwendete monoklonale Antikörper	19
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
4.1	Lösungen und Standardpuffer	22
4.1.1	Immunzytochemie	22
4.1.2	Rezeptorisolation und Western-Blot-Analyse	23
4.1.3	Immunhistochemie	25
4.2	Immunzytochemie	26
4.2.1	Kultivierung von HEK-Zellen	26
4.2.2	Durchführung	26

4.3	Rezeptorisolation und Nachweis der Somatostatin-5- und Somatostatin-2-Rezeptoren mittels Immunpräzipitation .....	28
4.3.1	Aufbereitung der Zellen .....	28
4.3.2	Aufbereitung des Gewebes.....	29
4.3.3	Isolierung der Membranproteine mittels Weizenkeimlecithin.....	29
4.3.4	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese .....	30
4.3.5	Western-Blot .....	30
4.3.6	Nachweis der Proteine.....	31
4.3.7	Präabsorption.....	31
4.4	Immunhistochemie .....	32
4.4.1	Präparate.....	33
4.4.2	Durchführung .....	34
4.4.3	Peptidneutralisation.....	37
4.4.4	Doppel-Immunfluoreszenz.....	37
4.4.4.1	Durchführung.....	38
4.5	Auswertung.....	40
4.6	Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und verwendete Substanzen.....	41
4.6.1	Antikörper .....	41
4.6.2	Laborgeräte und Labormaterialien .....	42
4.6.3	Immunzytochemie und Immunhistochemie .....	44
4.6.4	Western-Blot-Analysen .....	45
5	<b>Ergebnisse</b> .....	46
5.1	Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen.....	46
5.2	Western-Blot-Analysen .....	47
5.2.1	Western-Blot-Analysen an HEK-293-Zellen .....	47
5.2.2	Western-Blot-Analysen an humanem neuroendokrinem Tumorgewebe .....	48
5.3	Immunhistochemie .....	49
5.3.1	Immunhistochemische Untersuchungen an humanem Normalgewebe .....	50
5.3.2	Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen der humanen Hypophyse .....	52
5.3.3	Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen des humanen Pankreas.....	54
5.3.4	Immunhistochemische Untersuchungen an humanem Tumorgewebe.....	56

<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
6.1	Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen .....	61
6.2	Western-Blot-Analysen .....	62
6.3	Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Normalgeweben .....	63
6.3.1	Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen .....	68
6.4	Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumorgeweben .....	70
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>97</b>
9.1	Ehrenwörtliche Erklärung.....	97
9.2	Danksagung .....	98

## 1 Zusammenfassung

Somatostatin ist ein zyklisches Neuropeptid mit einem großen Wirkspektrum. Es ist im menschlichen Körper weit verbreitet und vermittelt seine biologischen Effekte über sechs G-Protein-gekoppelte Somatostatin-Rezeptoren (SSTR), bezeichnet als SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4 und SSTR5.

Die Überexpression der Somatostatin-Rezeptoren in vielen Tumoren macht diese zu einem molekularen Ziel von zunehmender Bedeutung in der Tumordiagnostik und -therapie. In der Vergangenheit wurden unter diesem Gesichtspunkt verschiedene Somatostatin-Analoga, wie Octreotid und Pasireotid, entwickelt. Das Ansprechen der verschiedenen Tumorarten auf die Somatostatin-Analoga hängt jedoch stark von der Anwesenheit der einzelnen SSTR-Subtypen ab. So wird die Wirksamkeit von Octreotid durch das Vorhandensein des SSTR2 und der Effekt von Pasireotid vor allem durch den SSTR5 im Tumorgewebe bestimmt. Um zu beurteilen, ob ein Patient einer Octreotid- oder einer Pasireotid-Therapie zugeführt werden sollte, ist die Bestimmung des SSTR-Expressionsprofils der Tumorzellen von entscheidender Bedeutung. Die Charakterisierung kann während der routinemäßigen histopathologischen Untersuchungen mit Hilfe von hoch-spezifischen Antikörpern durch immunhistochemische Färbungen erfolgen.

Zur Detektion des SSTR5 standen bislang hauptsächlich verschiedene polyklonale Antikörperserien zur Verfügung. Diese Antikörper sind nur eingeschränkt verfügbar und unterliegen großer Variabilität, deshalb finden sie in der Routinediagnostik keine Verwendung. Im Gegensatz dazu können monoklonale Antikörper in unbegrenzter Menge und in immer gleichbleibend hoher Qualität produziert werden. Bisher steht nur ein spezifischer monoklonaler Antikörper für den SSTR2 (UMB1 97-1) zur Verfügung. Ausgehend von dieser Problematik wurde der monoklonale Kaninchen-Anti-SSTR5-Antikörper UMB4 30-5 entwickelt. Dieser ist gegen das Carboxy-terminale Ende des humanen Somatostatin-Rezeptors 5 gerichtet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die ausführliche Charakterisierung des neuen monoklonalen Anti-SSTR5-Antikörpers UMB4 30-5. Zur Analyse der Sensitivität und Spezifität des Antikörpers wurden immunzytochemische Untersuchungen an stabil transfizierten Zellen, Western-Blot-Analysen, Präabsorptionskontrollen und immunhistochemische Färbungen mit dem UMB4 30-5 durchgeführt. Im Weiteren wurde parallel der monoklonale Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 in den Analysen eingesetzt,



um die Expression des SSTR5 mit dem Expressionsmuster des SSTR2 in normalen und neoplastischen humanen Geweben zu vergleichen.

Die Spezifität des monoklonalen Anti-SSTR5-Antikörpers UMB4 30-5 konnte durch folgende Ergebnisse demonstriert werden:

1. Eine membranständige immunzytochemische Färbung von SSTR5-exprimierenden HEK-293-Zellen und das Fehlen dieser Färbung in SSTR2-exprimierenden HEK-293-Zellen.
2. Die Detektion einer breiten Bande im Bereich von 55-70 kDa in den Western-Blot-Analysen an SSTR5-exprimierenden HEK-293-Zellen und in neuroendokrinem Tumorgewebe, nicht jedoch in SSTR2-exprimierenden HEK-293-Zellen.
3. Die spezifische, vorwiegend membranständige Detektion des SSTR5 in humanen, in Formalin fixieren und in Paraffinblöcken eingebetteten Normal- und Tumorgeweben mittels immunhistochemischer Färbungen. So fand sich der SSTR5 zum Beispiel in den Inselzellen des Pankreas, in den GH- und ACTH-produzierenden Zellen der Adenhypophyse, in neuroendokrinen Tumoren, Hypophysenadenomen, Phäochromozytomen und auch in epithelialen Tumoren, wie Prostata-, Zervix- und Mammakarzinomen.
4. Die Abwesenheit der immunhistochemischen Färbungen und des SSTR5-Immunsignals in den Western-Blot-Analysen nach Neutralisation des UMB4 30-5 mit seinem Peptidantigen.

Mittels der immunhistochemischen Färbungen durch den UMB4 30-5 und den UMB1 97-1 konnte unter anderem die hohe Prävalenz des SSTR5 und des SSTR2 in Hypophysenadenomen, neuroendokrinen Tumoren und Phäochromozytomen bestätigt werden. Des Weiteren konnte eine starke SSTR5-Expression in den ACTH-produzierenden Hypophysenadenomen nachgewiesen werden, welche den SSTR2 nicht exprimieren.

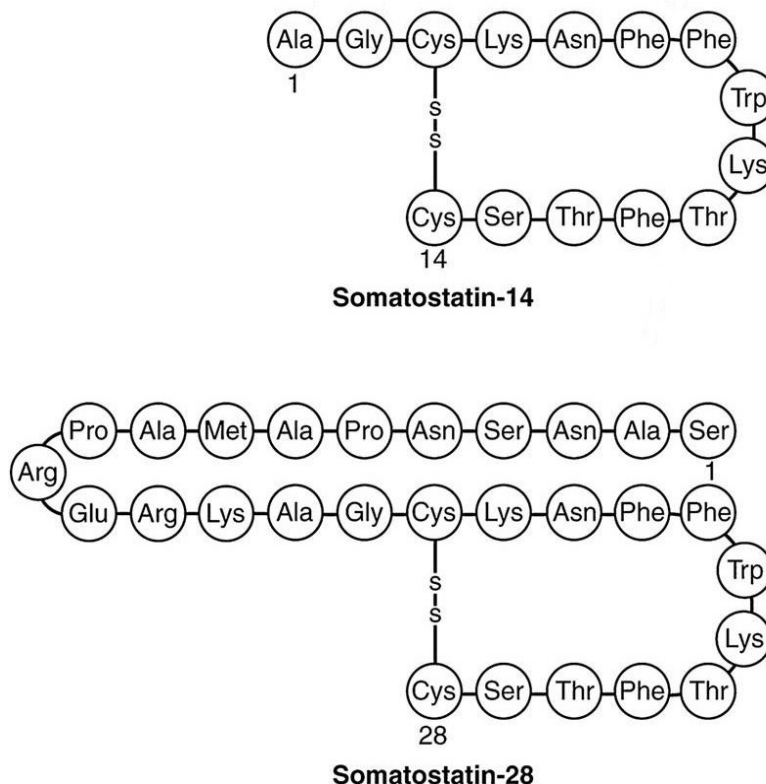
Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich der neu entwickelte monoklonale Antikörper UMB4 30-5 aufgrund seiner hohen Spezifität sowohl für den Nachweis des SSTR5 aus nativen Geweben im Western-Blot als auch für dessen Detektion in Paraffinschnitten humaner Gewebe eignet. Er ermöglicht somit in Zukunft die Erforschung der SSTR5-Signalwege und ihrer Regulation und stellt ein wertvolles Werkzeug für die Routine-Diagnostik zur Erfassung des SSTR5-Rezeptorstatus dar.

## 2 Einleitung

### 2.1 Somatostatin

Somatostatin (SST) ist ein zyklisches Neuropeptid, welches 1972 erstmalig aus dem Hypothalamus isoliert und charakterisiert wurde (Brazeau et al. 1973, Burgus et al. 1973, Koerker et al. 1974). Es kommt sowohl im zentralen und peripheren Nervensystem vor, als auch in anderen Geweben wie Pankreas, Nebenniere, Gastrointestinaltrakt, Niere, Prostata, Plazenta und in Immunzellen (Patel 1992, Mundschenk et al. 2003). Viele neoplastische Gewebe enthalten ebenfalls SST-Rezeptoren (SSTR), vor allem endokrine und neuroendokrine Tumore (NET), aber auch maligne Lymphome, Mammakarzinome, ZNS- und andere Tumore (Reubi et al. 1992, Robbins 1996).

Beim Menschen existieren zwei biologisch aktive Formen von Somatostatin (Reisine 1995), Somatostatin-14 (SS-14), welches aus 14 Aminosäuren aufgebaut ist, und Somatostatin-28 (SS-28), welches aus 28 Aminosäuren besteht und im Vergleich zum SS-14 am N-terminalen Ende verlängert ist (Pradayrol et al. 1980) (siehe Abb. 1).

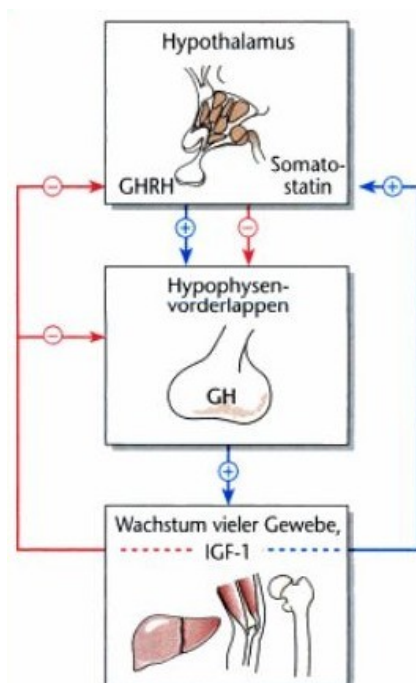


**Abb. 1:** Primärstruktur von Somatostatin-14 und Somatostatin-28 (nach Susini und Buscail 2006).

Beide werden aus einem 116 Aminosäuren umfassenden Präprosomatostatin und über die Zwischenstufe des Prosomatostatins mit 92 Aminosäuren durch Prohormonkonvertasen gebildet (Goodman et al. 1983, Montminy et al. 1984). Gewebeabhängig entsteht hierbei entweder SS-14 oder SS-28 (Reisine 1995). Ein Beispiel für eine derartig unterschiedliche Expression stellt der Gastrointestinaltrakt dar. SS-14 ist vor allem im Magen, Duodenum, Pankreas und im enterischen Nervensystem lokalisiert, wohingegen SS-28 vorwiegend in der Mukosa von Ileum und Colon nachzuweisen ist (Penman et al. 1983). Grundsätzlich zeigt SS-14 aber ein größeres Verteilungsspektrum (Reisine 1995, Patel und Srikant 1997).

### 2.1.1 Funktion von Somatostatin

Seine biologischen Effekte vermittelt Somatostatin über die Somatostatin-Rezeptoren, welche in Abschnitt 2.2 genauer beschrieben werden. Es kann hierbei sowohl als Neurotransmitter als auch als autokriner, parakriner oder endokriner Regulator wirken (Reichlin 1983, Patel 1999). Als Neurohormon wird Somatostatin im Hypothalamus produziert und inhibiert die Freisetzung des hypophysären Wachstumshormons (GH) (Brazeau et al. 1973). Über die GH-IGF-1-Achse (Insulin-like growth factor 1) vermindert SST durch Inhibition der GH-Sekretion auch die IGF-1-Produktion in der Leber (Abb. 2) (Serri et al. 1992). SST ist folglich der wichtigste Antagonist der Somatotropin-Wirkung und wirkt somit antiproliferativ und hemmend auf die Zelldifferenzierung.



**Abb. 2:** Hypothalamus-Hypophysen-Achse der Wachstumshormon-Sekretion. Im Hypothalamus gebildetes GH-Releasing-Hormon (GHRH) stimuliert (+) und Somatostatin hemmt (-) in der Hypophyse die Freisetzung von Wachstumshormon (GH). Die Wirkung von GH auf die Zielorgane wird größtenteils über das in der Leber gebildete IGF-1 vermittelt, aber auch direkt über GH. Die Regulation erfolgt über positive bzw. negative Rückkopplung (nach Hick und Hick 2009).

Als Neurotransmitter agiert SST im zentralen Nervensystem außerdem als Inhibitor der Sekretion von Dopamin, Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH), Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Thyreoidea-stimulierendem Hormon (TSH) (Patel 1999). Zusätzlich vermittelt es auch direkt inhibitorische Wirkungen auf die Schilddrüse, die Nebennieren und die Nieren (Patel 1999).

Im Gastrointestinaltrakt hemmt Somatostatin die Sekretion und Wirkung zahlreicher Peptidhormone. Dadurch werden Funktionen wie Motilität, Säureproduktion im Magen, Enzymfreisetzung im Pankreas und die Gallesekretion inhibiert. Die Freisetzung pankreatischer und gastrointestinaler Hormone wie Insulin, Glukagon, Gastrin, Sekretin, Cholezystokinin, Pepsin und VIP (Vasoaktives intestinales Peptid) nimmt unter Somatostatin-Einfluss ab (Arimura et al. 1975, Reichlin 1983, Aktories et al. 2009).

SST reguliert auch andere physiologische Prozesse wie die Nährstoffresorption, die Kontraktilität glatter Muskelzellen und die Neuromodulation (Patel 1999). Es wirkt vasokonstriktorisch (Sonnenberg et al. 1981) und hat durch die Hemmung der Proliferation von Lymphozyten und anderen Entzündungszellen einen Einfluss auf die Immunantwort (Karalis et al. 1994, Dalm et al. 2003a, Dalm et al. 2003b).

Die Sekretion von SST selbst wird über verschiedene Mechanismen beeinflusst. So haben Ionen, Nährstoffe, Neurotransmitter, Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine eine regulative Wirkung (Patel 1999). Diese Effekte sind gewebespezifisch. Die SST-Freisetzung aus den D-Zellen der Langerhans-Inseln wird zum Beispiel durch eine hohe Konzentration von Glukose, Aminosäuren und Lipiden im Darmlumen stimuliert, während die hypothalamische SST-Sekretion durch im Blutkreislauf zirkulierende Glukose inhibiert wird. Eine Membran-Depolarisation wirkt indessen sowohl auf neuronale als auch auf periphere SST-sezernierende Zellen (D-Zellen) stimulierend (Patel 1999).

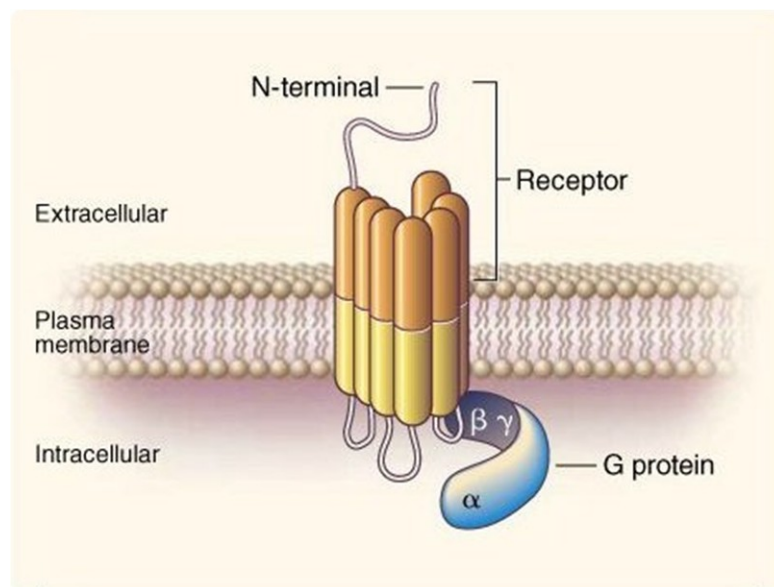
## **2.2 Somatostatin-Rezeptoren**

### **2.2.1 Aufbau und Struktur**

Die biologischen Effekte von Somatostatin werden über spezifische membrangebundene Rezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren wurden 1978 von Schonbrunn und Tashjian erstmals beschrieben (Schonbrunn und Tashjian 1978). Bislang konnten sechs Subtypen der Somatostatin-Rezeptoren (SSTR) auf fünf verschiedenen Chromosomen identifiziert werden, SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4 und SSTR5 (Taniyama et al. 2005, Schonbrunn

2008). Die Subtypen SSTR2A und 2B sind Spleißvarianten des SSTR2-Gens, die sich in der Länge des Carboxy-terminalen Endes unterscheiden (Vanetti et al. 1992, Patel 1999, Schonbrunn 2008). Bisher wurde jedoch in humanem Gewebe nur die SSTR2A-Variante gefunden (Fischer et al. 2008).

Bei den sechs Somatostatin-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit dem typischen Aufbau aus sieben hydrophoben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen (siehe Abb. 3). Das N-terminale Ende befindet sich extrazellulär und dient der spezifischen Liganden-Bindung, während der intrazellulär gelegene C-terminale Abschnitt durch Kopplung an G-Proteine die Signaltransduktion ins Zellinnere vermittelt (Patel 1999).



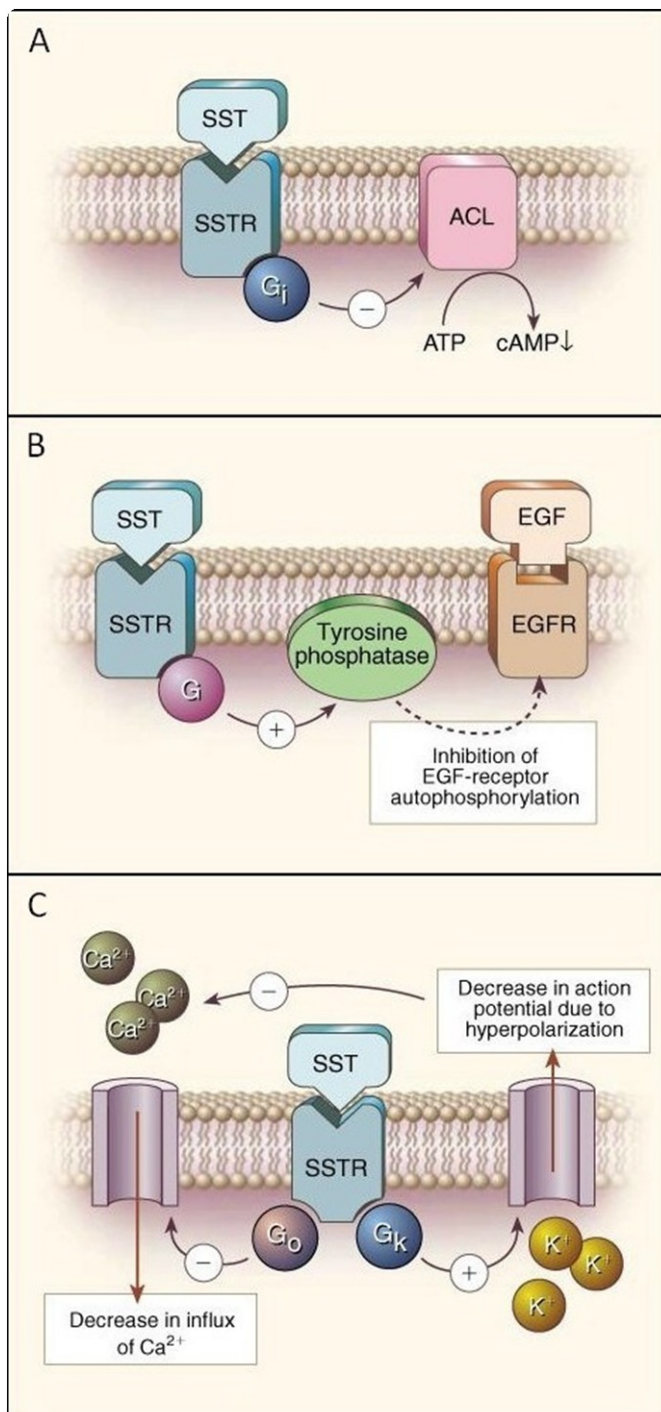
**Abb. 3:** Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Die Somatostatin-Rezeptoren gehören zu dieser Rezeptorfamilie mit dem typischen Aufbau aus sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen. Blau dargestellt ist das gebundene heterotrimere G-Protein, bestehend aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) (nach Lamberts et al. 1996).

Die Größe der SSTRs reicht von 356 bis zu 391 Aminosäuren, wobei die Primärstruktur der Rezeptoren zu 39-57 % identisch ist (Patel 1999). Das Molekulargewicht der Rezeptoren liegt zwischen 45 und 95 kDa (Helboe et al. 1997).

### 2.2.2 Signaltransduktion

Die Somatostatin-Rezeptoren 1-5 binden ihre natürlichen Liganden SS-14 und SS-28 mit ähnlich hoher Affinität im nanomolaren Bereich. Während die Rezeptoren SSTR1-4 SS-14 etwas stärker binden als SS-28, besitzt der SSTR5 eine 10-fach höhere Affinität zu SS-28

(Patel und Srikant 1997). Durch die Bindung von Somatostatin an einen der SSTRs werden inhibitorische heterotrimere G-Proteine ( $G_i/G_o$ ) und darauffolgende second-messenger-Systeme aktiviert (Reisine und Bell 1995). Bei allen sechs Rezeptor-Subtypen erfolgt die Signaltransduktion über die Hemmung der Adenylatcyclase (Abb. 4A) und die Aktivierung der Tyrosin-Phosphatase (Abb. 4B). SSTR2-5 haben außerdem einen Einfluss auf  $K^+$ -Kanäle, SSTR1 und SSTR2 auf  $Ca^{2+}$ -Kanäle (Abb. 4C), SSTR2 und SSTR5 auf die Phospholipase C. Alle Subtypen regulieren die Aktivität der MAP (mitogen-activated protein)-Kinase (Buscail et al. 1994, Patel 1999, Taniyama et al. 2005).



**Abb. 4:** Signaltransduktion der SSTRs.

**A:** Dargestellt ist die Hemmung der Adenylatcyclase (ACL). Die Aktivierung des SSTRs durch die Bindung von SST führt, vermittelt durch das inhibitorische G-Protein ( $G_i$ ), zur Hemmung (-) der ACL, woraufhin die intrazelluläre cAMP-Konzentration sinkt. **B:** Dargestellt ist die Aktivierung der Tyrosin-Phosphatase (Tyrosine phosphatase). Die Aktivierung des SSTRs durch die Bindung von SST führt, vermittelt durch das G-Protein ( $G_i$ ), zur Aktivierung (+) der Tyrosin-Phosphatase. Es wird vermutet, dass SST über die Hemmung der epidermal-growth-factor (EGF)-vermittelten Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors (EGFR) antimitotisch wirkt (gestrichelter Pfeil) (Liebow et al. 1989). **C:** Dargestellt ist der Einfluss der SSTRs auf Ionenkanäle. Die Aktivierung des SSTRs durch die Bindung von SST führt, vermittelt durch G-Proteine ( $G_o$  und  $G_k$ ), zur Hemmung (-) der  $Ca^{2+}$ -Kanäle und somit zur Minderung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms sowie zur Stimulation (+) des  $K^+$ -Ausstroms durch  $K^+$ -Kanäle (nach Lamberts et al. 1996).

### **2.2.3 Vorkommen**

Die humanen Somatostatin-Rezeptoren kommen in vielen Organen vor, meist auch mehrere Subtypen im selben Gewebe oder in derselben Zelle (Patel 1999). Sie konnten unter anderem im Gehirn, in der Hypophyse, im Gastrointestinaltrakt, im Pankreas, in den Nieren und Nebennieren, in der Schilddrüse, in Endothel- und in Immunzellen identifiziert werden (Reubi et al. 1992, Reisine und Bell 1995, Reubi et al. 2001). Im gesunden Organismus sind die SSTRs organ- und gewebespezifisch verteilt, wohingegen im Tumorgewebe ein heterogenes Expressionsmuster der SSTRs vorliegt (de Herder und Lamberts 2002).

Eine Vielzahl von Primärtumoren und deren Metastasen exprimiert Somatostatin-Rezeptoren in großer Dichte (de Herder und Lamberts 2002). Bekannte SSTR-tragende Tumore sind endokrine und neuroendokrine Tumore wie gastroenteropankreatische NET (GEP-NET), Hypophysenadenome, Schilddrüsenkarzinome, Insulinome, Glukagonome und Phäochromozytome. Aber auch in anderen Tumoren konnten SSTRs nachgewiesen werden, unter anderen in malignen Lymphomen, ZNS-, Mamma-, Nieren-, Prostata- und kleinzelligen Lungenkarzinomen und in deren Metastasen (Reubi et al. 1992, Robbins 1996, Patel 1999, Mundschenk et al. 2003).

#### **2.2.3.1 Somatostatin-Rezeptor-Subtypen in Tumoren**

Die SSTR-Überexpression in den verschiedenen Tumoren stellt eine wichtige Grundlage für deren Diagnostik und Therapie dar. Viele Erkenntnisse zur Verteilung der Rezeptor-Subtypen gehen auf die Forschung von Reubi et al. zurück (Reubi et al. 1992, Reubi et al. 2001). So konnte gezeigt werden, dass Neuroblastome, Meningeome, Medulloblastome, Mammakarzinome, Lymphome, klarzellige Nierenzellkarzinome, Paragangliome, kleinzellige Lungenkarzinome und hepatozelluläre Karzinome vorwiegend den SSTR2 exprimieren. Der SSTR1 ist der vorherrschende SSTR-Subtyp in Prostatakarzinomen und Sarkomen (Reubi et al. 2001, Hofland und Lamberts 2003). Phäochromozytome exprimieren sowohl den SSTR1 und den SSTR2 (Hofland und Lamberts 2003) als auch den SSTR3 (Mundschenk et al. 2003). Der Großteil der endokrin-inaktiven Hypophysenadenome weist den SSTR2 und in geringerem Umfang den SSTR3 und den SSTR5 auf (Reubi et al. 2001, Hofland und Lamberts 2003). Während in GH-produzierenden Hypophysenadenomen eine Dominanz von SSTR2 und SSTR5 gefunden wurde (Reubi et al. 2001, de Herder und Lamberts 2002), überwiegt in den ACTH-sezernierenden Hypophysenadenomen die SSTR5-Expression (86 % der Tumore) gegenüber der von SSTR2 (67 % der Tumore) (Schmid 2008).

In neuroendokrinen Tumoren kann der SSTR2 in 80 % und der SSTR5 in 70 % der Fälle nachgewiesen werden. Pankreatische Inselzelladenome exprimieren zu mehr als 80 % Somatostatin-Rezeptoren, wobei sie vorwiegend den SSTR2 aufweisen (Lamberts et al. 1996, de Herder und Lamberts 2002, Hofland und Lamberts 2003). Tabelle 1 zeigt einen Überblick über verschiedene Tumore und deren SSTR-Expressionsprofil.

**Tabelle 1:** Expression von Somatostatin-Rezeptor (SSTR)-Subtypen in verschiedenen humanen Tumoren. Die Werte geben den Prozentsatz an, zu dem die untersuchten Tumore die mRNA der entsprechenden SSTR-Subtypen exprimieren (n.u. = nicht untersucht) (nach Hofland und Lamberts 2003).

Tumorart	SST-Rezeptor-Subtyp				
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
<b>Hypophysenadenome</b>					
<b>GH-produzierend</b>	44 %	96 %	44 %	5 %	86 %
<b>ACTH-produzierend</b>	56 %	67 %	25 %	0 %	86 %
<b>hormonell-inaktiv</b>	38 %	75 %	43 %	13 %	48 %
<b>GEP-NET</b>					
<b>Karzinoid</b>	76 %	80 %	43 %	68 %	77 %
<b>Gastrinom</b>	79 %	93 %	36 %	61 %	93 %
<b>Insulinom</b>	76 %	81 %	38 %	58 %	57 %
<b>hormonell-inaktive Inselzelladenome</b>	58 %	88 %	42 %	48 %	50 %
<b>Nierenzellkarzinome, klarzellig</b>	85 %	100 %	0 %	50 %	n.u.
<b>Mammakarzinom</b>	33 %	99 %	38 %	23 %	18 %
<b>Meningeom</b>	46 %	100 %	33 %	50 %	71 %
<b>Gliome</b>	100 %	100 %	67 %	71 %	57 %
<b>Neuroblastome</b>	0 %	100 %	17 %	n u.	n.u.
<b>Kolorektales Karzinom</b>	27 %	87 %	22 %	10 %	46 %
<b>Medulläres Schilddrüsenkarzinom</b>	29 %	79 %	36 %	0 %	64 %
<b>Phäochromozytom</b>	100 %	100 %	73 %	73 %	73 %



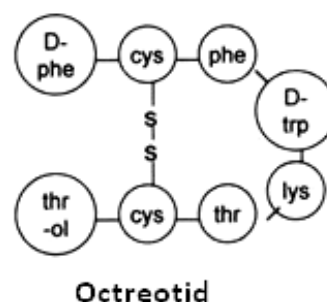
## 2.3 Somatostatin-Analoga

Aufgrund seiner vielfältigen physiologischen Wirkungen erhoffte man sich von Somatostatin, dass es zur Therapie verschiedener Erkrankungen genutzt werden könne. Dank der inhibitorischen Wirkung auf die Freisetzung vieler Peptidhormone, wie die GH-Sekretion, und der nachgewiesenen SSTR-Expression zahlreicher Tumore wurde durch die therapeutische Verwendung von Somatostatin ein großer Fortschritt erwartet. Vor allem für die Behandlung der Akromegalie sowie für endokrine und neuroendokrine Tumore wurde ein entscheidender Gewinn erhofft (Wynick et al. 1989, Patel 1999).

Jedoch wird die klinische Nutzung von Somatostatin durch seine kurze Halbwertszeit von nur etwa drei Minuten begrenzt, was eine kontinuierliche intravenöse Gabe in der Anwendung nötig macht. Zusätzliche Probleme bereitet der Rebound-Effekt auf die Hormonsekretion nach Absetzen der Therapie. Auch das potentielle breite Nebenwirkungsspektrum durch den Einfluss auf viele verschiedene Organe begrenzt die Eignung von Somatostatin zur Therapie (Wynick et al. 1989). Aufgrund dessen wurden viele Bemühungen unternommen, Somatostatin-Analoga mit einer längeren Halbwertszeit als SST und einer möglichst differenzierten Wirkung auf die einzelnen Zielorgane zu synthetisieren (Wynick et al. 1989).

### 2.3.1 Octreotid

Als erstes Somatostatin-Analogon kam Octreotid (Sandostatin®, SMS 201-995), ein zyklisches Octapeptid (Abb. 5), in den klinischen Gebrauch (Bauer et al. 1982).



**Abb. 5:** Primärstruktur von Octreotid (nach Kaltsas et al. 2002).

Octreotid weist ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie SST auf, hat aber eine längere Halbwertszeit von etwa zwei Stunden bei subkutaner Gabe und bewirkt keinen Rebound-Effekt nach dem Absetzen der Therapie. Seine Wirkungen vermittelt es, im Gegensatz zu SST, weitgehend selektiv über den SSTR2. Im Bezug auf die Inhibition der GH-Sekretion

wirkt Octreotid spezifischer und ist 45-fach potenter als SST. Die Glukagon- und Insulin-Sekretion hemmt es 11-mal beziehungsweise 1,3-mal stärker (Lamberts et al. 1996). Des Weiteren vermindert es auch die Freisetzung der pankreatischen Peptide Gastrin, Sekretin und Motilin (Kraenzlin et al. 1985, Creutzfeldt et al. 1987), wirkt aber auf die hypophysären Hormone TRH und CRH nur leicht supprimierend (Lightman et al. 1986).

Neben der subkutanen Darreichungsform, die aufgrund der Wirkdauer dreimal täglich appliziert werden muss, gibt es auch Depotpräparate wie zum Beispiel Octreotid-LAR, welches nur alle 4 Wochen intramuskulär verabreicht wird (Murphy et al. 2010, Petersen et al. 2011). Andere zyklische Somatostatin-Analoga mit ähnlicher Affinität und Spezifität sind Vapreotid (RC-160) und Lanreotid (BIM-23014) (Lamberts et al. 1996).

### **2.3.1.1 Indikationen**

Octreotid ist indiziert zur Therapie der Akromegalie und zur symptomatischen Behandlung bei gastroenteropankreatischen Hormon-produzierenden Tumoren, wie neuroendokrinen Tumoren (Karzinoide, VIPome und Glukagonome) (Murphy et al. 2010).

Bei Akromegalie-Patienten senkt Octreotid effektiv die GH- und IGF-1-Sekretion. Des Weiteren führt es zu einer Reduktion der Tumorgroße und mildert die klinische Manifestation der Krankheit (Lamberts et al. 1996, Ben-Shlomo und Melmed 2008). Octreotid reduziert die Kopfschmerzen, die häufig mit der Akromegalie assoziiert sind. Auch weitere Symptome wie Gelenkschmerzen, vermehrte Schweißproduktion, Kardiomyopathie und die Schlaf-Apnoe werden bei einem Großteil der behandelten Patienten reduziert beziehungsweise komplett beseitigt (Lamberts et al. 1996). Dadurch, dass sich mit Hilfe von Octreotid ein schneller und effektiver therapeutische Effekt erzielen lässt, ist es besonders gut nutzbar zur neoadjuvanten Anwendung, um den Tumor zu verkleinern und den Allgemeinzustand der Patienten zu verbessern, sowie zur adjuvanten Therapie nach unvollständiger operativer Entfernung des Hormon-produzierenden Tumorgewebes (Lamberts et al. 1996).

Octreotid wird darüber hinaus zur symptomatischen Behandlung endokrin aktiver Tumoren des Gastrointestinaltrakts, wie VIPomen, Glukagonomen, Insulinomen und Karzinoiden eingesetzt (Aktories et al. 2009, Appetecchia und Baldelli 2010). Mittel der Wahl ist es bei Inoperabilität oder beim Vorhandensein von Metastasen neuroendokriner Tumore (Appetecchia und Baldelli 2010, Modlin et al. 2010). Hierbei mildert Octreotid Symptome wie Flush und Diarrhoe (O'Toole et al. 2000). Insgesamt führt Octreotid zu einer entscheidenden Verbesserung der Lebensqualität (Lamberts et al. 1996). Jedoch zeigen

nahezu alle Patienten nach Wochen bis Monaten eine erneute Verstärkung der Symptome und eine zunehmend verminderte Hemmung der Tumor-Hormonsekretion. Dieser Effekt kann anfangs mit einer steigenden Octreotid-Dosis kompensiert werden, aber letztendlich wird das Medikament bei fast allen Patienten unwirksam (Lamberts et al. 1996, Hofland und Lamberts 2003). Der Verlust der Sensitivität der endokrinen Tumore für Octreotid ist wahrscheinlich assoziiert mit einer zunehmend verminderten SSTR-Expression und einem Wachstum von Tumorzell-Klonen, denen die SSTR-Subtypen fehlen, an denen Octreotid mit hoher Affinität bindet und über die es seine Wirkung vermittelt (Hofland und Lamberts 2003).

Auch in der Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren (NET) findet Octreotid Anwendung. An Radionuklide gekoppeltes Octreotid, wie zum Beispiel  $^{111}\text{Iridium}$ -Diethylenetriamin-Pentaessigsäure (DPTA)-Octreotid, wird zur szintigrafischen Darstellung von NETs eingesetzt, bei denen eine SSTR2-Expression vermutet wird (Lamberts et al. 2002a, Lamberts et al. 2002b). Durch Kopplung von Octreotid an Radionuklide, die Positronen emittieren, wie  $^{68}\text{Gallium}$ , wird die Diagnostik mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglicht (Prasad et al. 2007).

Aktuell wird in klinischen Studien die peptidrezeptorvermittelte Radiotherapie (PRRT) mittels Radionuklid-gekoppeltem Octreotid getestet, die als großer Fortschritt in der Behandlung von neuroendokrinen Tumoren angesehen wird. Sie basiert auf der höheren SSTR-Dichte auf den Tumorzellen, verglichen mit dem umliegenden Gewebe und der Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes, wodurch eine Akkumulation des Radiopeptidtherapeutikums im Zielgewebe erfolgt (Grozinsky-Glasberg et al. 2008, Teunissen et al. 2011). Die Studienergebnisse zeigen eine Symptombesserung und einen Überlebensvorteil bei Patienten durch die PRRT (Teunissen et al. 2011).

### **2.3.1.2 Nebenwirkungen**

Octreotid kann unerwünschte gastrointestinale Wirkungen wie Übelkeit, krampfartige Bauchschmerzen und Diarrhoe verursachen (Aktories et al. 2009). Diese Nebenwirkungen können innerhalb von Stunden nach der ersten Injektion beginnen; sie treten dabei dosisabhängig auf. In der Regel klingen sie nach zehn bis vierzehn Tagen spontan ab (Lamberts et al. 1996). Bei Langzeitgabe kann es zur Bildung von Gallensteinen kommen, vermutlich infolge verminderter Gallenblasen-Kontraktilität; eine regelmäßige sonographische Kontrolle der Gallenblase ist daher indiziert (Aktories et al. 2009). Da Octreotid die Insulin-Sekretion

im Vergleich zu Somatostatin nur sehr wenig beeinflusst, sind Störungen des Blutzuckerspiegels selten (Aktories et al. 2009).

### **2.3.2 Pasireotid**

Pasireotid (SOM230) ist ein universelles Somatostatin-Analogon, welches sich aktuell in Phase II und III der klinischen Evaluation für die Behandlung von Patienten mit Tumoren neuroendokrinen Ursprungs befindet (Horsmans et al. 2012). Diese Tumore umfassen sowohl Hypophysen-Adenome, die Akromegalie verursachen, als auch neuroendokrine Tumore (NET). Seit April 2012 ist Pasireotid von der European Medicines Agency (EMA) EU-weit zur Behandlung des Morbus Cushing zugelassen.

Pasireotid ist ein zyklisches Hexapeptid mit einer hohen Bindungsaffinität zu den SSTR1, SSTR2, SSTR3 und zum SSTR5 (Schmid 2008). Studien mit Akromegalie-, Morbus Cushing- und NET-Patienten zeigen, dass die Verträglichkeit von Pasireotid gut ist (Petersenn et al. 2010, Horsmans et al. 2012). Es besitzt eine Halbwertszeit von etwa 23 Stunden und wirkt somit länger als Octreotid. Pasireotid ist stärker wirksam bezüglich der Normalisierung der GH- und IGF-1-Konzentration im Blut (Bruns et al. 2002, Arnaldi und Boscaro 2010) und hemmt effektiv die ACTH-Freisetzung aus corticotropen Adenomen (Schmid 2008).

#### **2.3.2.1 Indikation**

Pasireotid erhielt im April 2012 von der EMA die EU-weite Zulassung zur Behandlung des Morbus Cushing. Es kann eingesetzt werden für Patienten, bei denen ein chirurgischer Eingriff nicht erfolgreich gewesen ist oder für die ein chirurgischer Eingriff keine Option darstellt. Die Zulassung erfolgte nach einer Phase-III-Studie zur Behandlung des Morbus Cushing mit Pasireotid von Colao et al. (Colao et al. 2012). Nach einer Therapiedauer von sechs Monaten war bei 88 % der Patienten ein Rückgang des freien Kortisols im 24-Stunden-Urin (UFC, urinary free cortisol) feststellbar. Eine Normalisierung des 24-Stunden-UFC konnte dosisabhängig bei 15-26 % der Patienten nachgewiesen werden (Colao et al. 2012, Tritos und Biller 2012). Die derzeitigen Daten weisen darauf hin, dass eine Stufen-Kombinationstherapie mit Ketoconazol, Cabergolin und Pasireotid einen guten Therapieeffekt bei Cushing-Patienten bringen kann (Feelders et al. 2010, Tritos und Biller 2012).

### **2.3.2.2 Mögliche weitere Indikationen**

Pasireotid wurde in Phase-II-Studien zu seiner Effizienz und Sicherheit in der Behandlung der Akromegalie getestet (Pertersenn et al. 2010). Nach dreimonatiger Verabreichung führte es bei zirka einem Drittel der Patienten zu einer biochemischen Kontrolle der Erkrankung. Bei 39 % der Patienten konnte eine Reduktion des Tumervolumens um mehr als 20 % erreicht werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Pasireotid eine viel versprechende neue Behandlungsmöglichkeit für die Akromegalie darstellen könnte (Manjila et al. 2010, Petersenn et al. 2010). In weiterfolgenden Phase-III-Studien wird nun die Wirksamkeit von Pasireotid im Vergleich zu Octreotid geprüft (Petersenn et al. 2010).

Auch die Nutzung von Pasireotid zur Therapie von neuroendokrinen Tumoren wird derzeit in klinischen Studien überprüft. Vorläufige Ergebnisse einer Phase-II-Studie von Kvols et al. zeigen, dass Pasireotid die Symptome des Karzinoid-Syndroms, Diarrhoe und Flush, bei Patienten mit metastasierten, Octreotid-resistenten NET effektiv beeinflussen kann (Schmid 2008, Oberg 2011). In einer laufenden Phase-III-Studie wird die Wirksamkeit von Pasireotid-LAR mit der von Octreotid-LAR verglichen. Eingeschlossen werden hier Patienten mit metastasierten gastroenteropankreatischen NETs, deren Symptome inadäquat mit Somatostatin-Analoga beherrscht werden können (Oberg 2012).

### **2.3.2.3 Nebenwirkungen**

In den bisherigen Studien zeigte sich bei Pasireotid ein ähnliches Nebenwirkungsprofil wie bei Octreotid. Pasireotid kann ebenfalls zu gastrointestinalen Symptomen, wie Übelkeit und Bauchschmerzen, und zur Bildung von Gallensteinen führen. Eine Ausnahme bei den unerwünschten Wirkungen stellt jedoch die Hyperglykämie dar; sie tritt unter Pasireotid häufiger auf (Colao et al. 2012, Tritos und Biller 2012).

### **2.3.3 Bindungsaffinität zu den Somatostatin-Rezeptor-Subtypen**

Die Somatostatin-Analoga weisen eine unterschiedlich hohe Affinität zu den einzelnen SSTR-Subtypen auf (siehe Tabelle 2). Somatostatin bindet an alle fünf Rezeptor-Subtypen, SSTR1-5, mit hoher Affinität (Bruns et al. 1994, Bruns et al. 2002). Octreotid hingegen interagiert mit dem SSTR2 mit sehr hoher und mit den SSTR3 und SSTR5 mit etwas verminderter Bindungsaffinität, während es mit den Rezeptoren SSTR1 und SSTR4 kaum bis gar nicht reagiert (Bruns et al. 2002). Pasireotid weist eine hohe Affinität zu den SSTR1, 2, 3 und 5 auf, den SSTR4 bindet es aber ebenfalls nur mit sehr geringer Affinität (Schmid 2008).

Im Vergleich zu Octreotid interagiert Pasireotid mit dem SSTR5 und dem SSTR1 zirka 40-fach beziehungsweise 30-fach stärker, mit dem SSTR2 hingegen geringfügig schwächer (Schmid 2008) (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Bindungsaffinität von Somatostatin, Octreotid und Pasireotid an den fünf Somatostatin-Rezeptor-Subtypen (SSTR1-5) (nach Bruns et al. 2002, Schmid und Schoeffter 2004, Schmid 2008).

Agonist	Bindungsaffinität (IC <sub>50</sub> in nmol/l)				
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
<b>Somatostatin</b>	0,93	0,15	0,56	1,5	0,29
<b>Octreotid</b>	280	0,38	7,1	>1000	6,3
<b>Pasireotid</b>	9,3	1	1,5	>1000	0,16
<b>Octreotid/Pasireotid</b>	30	0,4	5	-	40

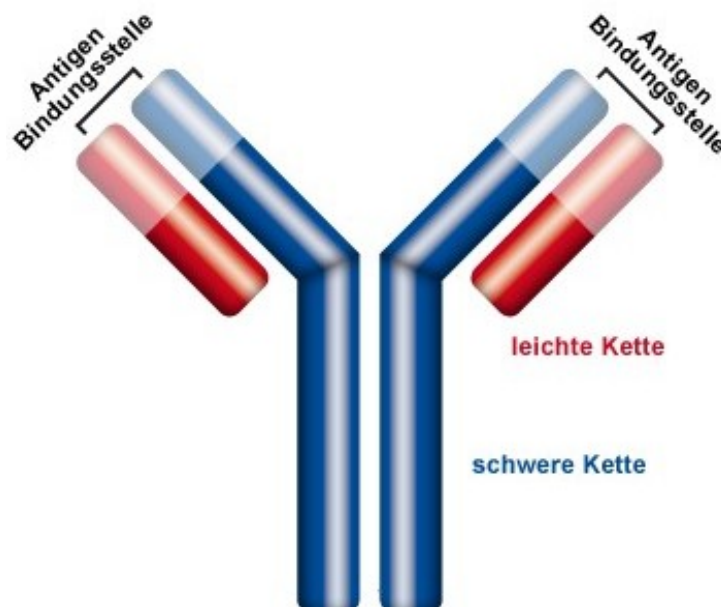
Durch die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Somatostatin-Analoga ergeben sich auch verschiedene Anwendungsmöglichkeiten, da das Ansprechen von Tumoren auf Somatostatin-Analoga stark von den vorhandenen SSTR-Subtypen abhängt (Schulz et al. 1998b). Besonders das breite Rezeptor-Bindungsprofil von Pasireotid und die höhere Affinität zum SSTR5 eröffnet Möglichkeiten zur Nutzung von Pasireotid. Es kann nicht nur als Alternative zu Octreotid zur Therapie von Akromegalie- und Karzinoid-Patienten angewendet werden, sondern auch bei Patienten, die nicht auf Octreotid ansprechen oder bei denen dessen Wirkung nachgelassen hat. Außerdem eignet sich Pasireotid zur Behandlung von weiteren Erkrankungen, die aufgrund ihrer SSTR-Expression nicht durch Octreotid beeinflusst werden können, wie zum Beispiel der Morbus Cushing (Schmid 2008).

## 2.4 Antikörper

Antikörper (Immunglobuline, Ig) sind Bestandteil der spezifischen humoralen Immunantwort von Wirbeltieren. Die Hauptaufgabe dieser Glykoproteine besteht darin, körperfremde pathogene Substanzen (Antigene) spezifisch zu binden und für das restliche Immunsystem zu markieren. Sie werden von Plasmazellen als Antwort auf die Gegenwart eines Antigens produziert. B-Lymphozyten können fünf verschiedene Isotypen von Antikörpern erzeugen, IgM, IgG, IgA, IgE und IgD, wobei die Immunglobuline G am häufigsten auftreten. Bedingt

durch ihre charakteristischen schweren Ketten aktiviert jeder Isotyp einen anderen Effektormechanismus des Immunsystems (Dübel et al. 2004, Hahn et al. 2005).

Ein typisches Immunglobulin G (IgG)-Molekül besteht aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken kovalent verbunden sind (siehe Abb. 6). Die Antigenbindung wird durch die beiden F<sub>V</sub>-Regionen vermittelt, von denen sich jede jeweils aus einer variablen Domäne der leichten (V<sub>L</sub>) und der schweren Kette (V<sub>H</sub>) zusammensetzt. Die konstanten Regionen eines Antikörpers (F<sub>C</sub>) vermitteln die Aktivierung verschiedener Effektorfunktionen, wie zum Beispiel die Bindung von Makrophagen oder die Aktivierung des Komplementsystems. Somit erreichen die Antikörper ihre hohe Wirksamkeit durch die Zusammenarbeit mit dem restlichen Immunsystem (Dübel et al. 2004).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung eines Immunglobulin-G-Moleküls. Das Molekül besteht aus zwei leichten (dargestellt durch rote Balken) und zwei schweren Ketten (dargestellt durch blaue Balken), die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die variablen Domänen der schweren und leichten Ketten sind heller dargestellt; sie stellen den antigenbindenden Teil des Antikörpers dar, der für die Spezifität ausschlaggebend ist (<http://www.immunodefekte.info/antikörper.html>).

Antikörper werden von differenzierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) produziert, nachdem diese durch ihr spezifisches Antigen stimuliert wurden. Eine Plasmazelle und ihre Klone bilden dann Immunglobuline ein und derselben Spezifität und Klasse. Ein Antigen verfügt über mehrere kleine antigene Bereiche (Epitope), welche von verschiedenen Antikörpern erkannt werden können. Die Mischung aus diesen Antikörpern, die jeweils ein unterschiedliches Epitop am selben Antigen erkennen und von verschiedenen aktivierten B-

Lymphozyten produziert werden, nennt man polyklonal. Sie entsteht bei der physiologischen Immunreaktion gegen ein Antigen. Hiervon unterscheidet man monoklonale Antikörper. Diese stammen von einer einzigen Plasmazelle ab und erkennen nur ein Epitop des Antigens (Dübel et al. 2004, Hahn et al. 2005).

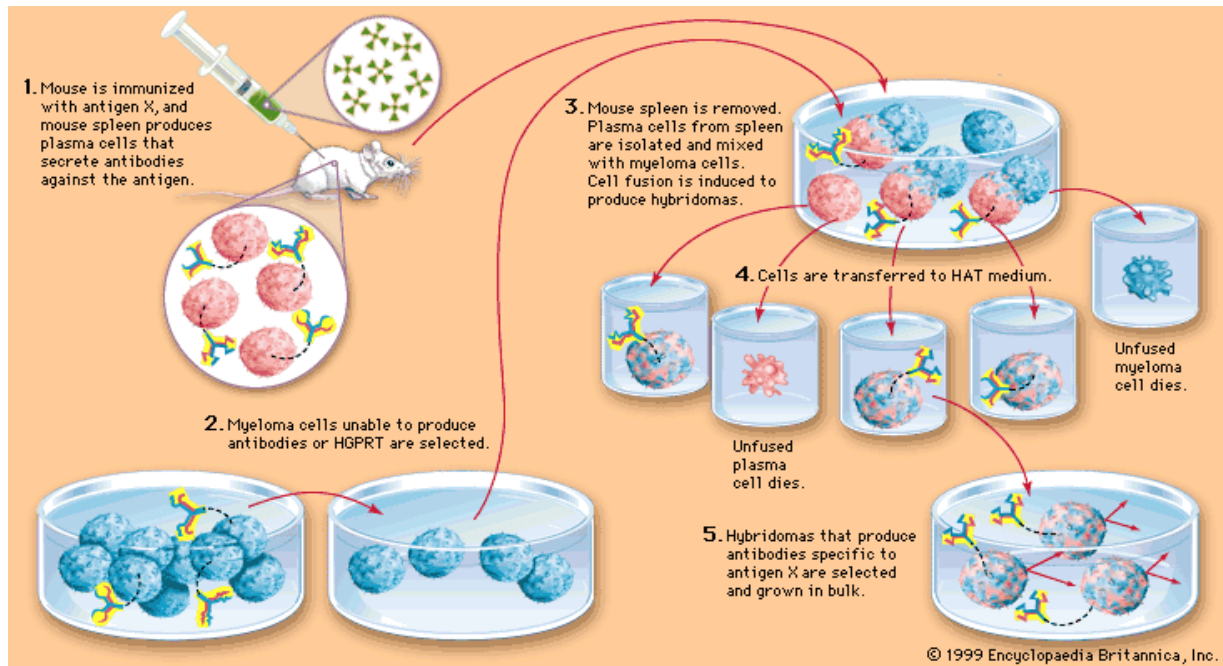
Für die meisten Anwendungen, wie zum Beispiel bei der Immunhistochemie, ist die Verwendung eines polyklonalen Antikörpergemisches nicht ratsam, da es aufgrund der Vielzahl von vorhandenen Immunglobulinen auch zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen kann (Dübel et al. 2004). Monoklonale Antikörper sind hingegen sehr spezifisch. Diese Eigenschaft macht sie für die Anwendung in vielen Bereichen attraktiv (Dübel et al. 2004).

#### **2.4.1 Herstellung monoklonaler Antikörper**

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurde erstmals 1975 von Köhler und Milstein beschrieben (Köhler und Milstein 1975). Bei der von ihnen entwickelten Hybridom-Technologie werden Antikörper-produzierende Plasmazellen mit unbegrenzt wachsenden Myelomzellen fusioniert, wie in Abbildung 7 dargestellt (de StGroth und Scheidegger 1980). Zunächst wird ein Versuchstier (z.B. Kaninchen, Maus oder Ratte) durch mehrmalige Injektion des Antigens, gegen welches der monoklonale Antikörper gerichtet sein soll, immunisiert. Bei ausreichend hohen Antikörper-Titern wird den Tieren die Milz entnommen, aus dieser werden anschließend die vorhandenen Lymphozyten isoliert (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Da die Lymphozyten nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen, werden sie mit Zellen fusioniert, die über ein unbegrenztes Wachstum verfügen, um eine möglichst lange Produktion von Antikörpern zu gewährleisten. Hierbei nutzt man Myelomzellen, maligne entartete Zellen der B-Zell-Reihe, die selbst keine Immunglobuline herstellen können. Um die Zellverschmelzung zu erreichen, werden die Milzlymphozyten und Myelomzellen in eine Polyethylenglykol-Lösung gegeben (Ganten und Ruckpaul 2008). Hierbei entsteht eine Mischung aus verschiedenen Zellen. Unfusionierte Myelomzellen und Myelom-Myelomzell-Hybride werden durch Inkubation in einem Selektionsmedium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (HAT-Medium), entfernt, da den Myelomzellen ein entsprechendes Enzym fehlt, um im HAT-Medium zu überleben (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Unfusionierte Plasmazellen und Plasmazell-Plasmazell-Hybride sterben aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer nach kurzer Zeit ab. Somit bleiben nur die gewünschten fusionierten Plasmazell-Myelomzell-Hybride übrig. Anschließend werden die gesuchten Antikörper-



produzierenden Hybridomzellen mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Immunosorbent-Assays (ELISA) isoliert (Ganten und Ruckpaul 2008). Die isolierten Hybridomzellen werden nun kloniert und kultiviert. Der gesuchte monoklonale Antikörper wird in den Kulturüberstand der Hybridomzellen abgegeben und kann zur Anwendung weiter genutzt werden. Ein Teil der so etablierten stabilen Klone wird in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um eine dauerhafte Verfügbarkeit des monoklonalen Antikörpers zu gewährleisten (Ganten und Ruckpaul 2008).



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Herstellung von monoklonalen Antikörpern. **1.** Immunisierung des Versuchstieres mit dem gewünschten Antigen. Daraufhin entstehen Plasmazellen, die den gewünschten Antikörper produzieren. **2.** Parallel werden Myelomzellen kultiviert, welche selbst keine Antikörper herstellen. **3.** Bei ausreichend hohem Antikörpertiter wird die Milz des Versuchstieres entnommen und die vorhandenen Plasmazellen isoliert. Anschließend erfolgt die Fusion der Myelomzellen mit den Plasmazellen zu Hybridomzellen. **4.** Die Zellen werden in einem HAT-Medium inkubiert und somit selektiert. **5.** Die Plasmazell-Myelomzell-Hybride, welche den gewünschten Antikörper herstellen, werden mittels ELISA isoliert und anschließend kultiviert (Encyclopædia Britannica, Inc. 1999).

#### **2.4.2 In der vorliegenden Arbeit verwendete monoklonale Antikörper**

Der in dieser Arbeit charakterisierte Antikörper UMB4 30-5 ist ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper, hergestellt von Epitomics (Burlingame, Kalifornien, USA) im Auftrag des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena. Er detektiert die Aminosäuresequenz 344 bis 364 (QEATPPAHRAAANGLMQTSKL) am carboxyterminalen Ende des humanen Somatostatin-Rezeptors 5.

Um das Expressionsmuster des SSTR5 mit dem des SSTR2 vergleichen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit parallele Untersuchungen mit dem monoklonalen Kaninchen-Antikörper UMB1 97-1 durchgeführt, welcher in früheren Studien bereits ausführlich charakterisiert worden ist (Fischer et al. 2008).

### 3 Zielsetzung

Da viele Tumore eine Überexpression von Somatostatin-Rezeptoren aufweisen, stellen diese Rezeptoren ein molekulares Ziel von zunehmender Bedeutung in der Tumordiagnostik und -therapie dar (Reubi 2003, Körner et al. 2012). Das Ansprechen der einzelnen Tumorarten auf Somatostatin-Analoga hängt jedoch stark von der Anwesenheit bestimmter SSTR-Subtypen ab (Schulz et al. 1998b, Schmid et al. 2012). So wird die Wirksamkeit von Octreotid durch das Vorhandensein des SSTR2 im Tumorgewebe bestimmt (Fougner et al. 2008, Casarini et al. 2009). Im Vergleich zu Octreotid interagiert das neu entwickelte Somatostatin-Analogon Pasireotid mit dem SSTR5 wesentlich stärker und vermittelt auch über diesen Rezeptor seine Effekte (Schmid 2008). Um beurteilen zu können, ob ein Patient einer Octreotid- oder einer Pasireotid-Therapie zugeführt werden sollte, ist die Bestimmung des SSTR-Expressionsprofils der Tumorzellen von entscheidender Bedeutung (Appetecchia und Baldelli 2010, Lupp et al. 2011). Die Expression der SSTRs in einem Tumor kann sehr gut mittels Immunhistochemie während der routinemäßigen histopathologischen Untersuchung charakterisiert werden. Diese Methode ist jedoch von der Verfügbarkeit hoch-spezifischer Antikörper abhängig (Lupp et al. 2011, Schmid et al. 2012). Bisher wurde aber nur ein spezifischer monoklonaler Kaninchen-Antikörper (UMB1 97-1) für den SSTR2 entwickelt (Fischer et al. 2008).

Zur Detektion des SSTR5 standen bislang hauptsächlich verschiedene polyklonale Antikörperseren zur Verfügung (Helboe und Møller 2000, Bhandari et al. 2008, Pisarek et al. 2010a, Pisarek et al. 2010b, Mazzucchelli et al. 2011). Im Gegensatz zu diesen nur eingeschränkt verfügbaren und großer Variabilität unterliegenden Antikörpern können monoklonale Antikörper in unbegrenzter Menge und in immer gleichbleibend hoher Qualität produziert werden (Lupp et al. 2011, Schmid et al. 2012). Ausgehend von dieser Problematik wurde der monoklonale Kaninchen-Antikörper UMB4 30-5 entwickelt. Dieser ist gegen das C-terminale Ende des humanen SSTR5 (hSSTR5) gerichtet.

Das Ziel dieser Arbeit war die ausführliche Charakterisierung des neuen monoklonalen Anti-hSSTR5-Antikörpers UMB4 30-5. Zur Analyse der Sensitivität und Spezifität des Antikörpers wurden immunzytochemische Untersuchungen an stabil transfizierten Zellen, Western-Blot-Analysen, Präabsorptionskontrollen und immunhistochemische Färbungen mit dem UMB4 30-5 durchgeführt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe des neuen monoklonalen Kaninchen-Antikörpers UMB4 30-5 die Expression des SSTR5 in normalen und neoplastischen humanen Geweben zu untersuchen und diese mit dem Expressionsmuster des SSTR2 zu vergleichen. Hierfür wurde in den Untersuchungen parallel der monoklonale Kaninchen-Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 eingesetzt, welcher bereits ausführlich charakterisiert worden ist (Fischer et al. 2008).

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Lösungen und Standardpuffer

#### 4.1.1 Immunzytochemie

##### *DMEM(+)-Medium*

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)

versetzt mit 10 Vol. % fetalem Kälberserum

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

0,1 mg/ml Streptomycin

##### *10x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), pH 7,4*

8 g/l Natriumchlorid

0,2 g/l Kaliumchlorid

1,44 g/l Natriumhydrogenphosphat

0,24 g/l Dikaliumhydrogenphosphat

in 1000 ml Aqua bidest.

##### *Phosphat-Puffer*

Lösung A: 27,60 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  / 1 Aqua bidest.

Lösung B: 35,63 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  / 1 Aqua bidest.

mischen: 132,8 ml der Lösung A + 566,7 ml der Lösung B; auffüllen auf 1 Liter

##### *Zamboni-Fixierlösung, pH 6,9*

4 % Paraformaldehyd

0,2 % Pikrinsäure

in Phosphat-Puffer

*15x TPBS, pH 7,4*

18,16 g TRIS

7,5 g Thiomersal

135 g Natriumchlorid

700 ml Phosphat-Puffer

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

#### **4.1.2 Rezeptorisolation und Western-Blot-Analyse**

*Radioimmunpräzipitations-Puffer (RIPA-Puffer, Zellaufschlusspuffer)*

8,8 g Natriumchlorid

6 g TRIS-HCl

0,9 g EDTA (5 mM)

in 1000 ml Aqua bidest. lösen und auf pH 7,4 einstellen

10 ml Igepal 1 % (Nonidet P-40)

5 g Natriumdesoxycholat

5 ml SDS (20 %) hinzufügen

*5x SDS-Probenpuffer (sodium dodecyl sulfate), pH 6,8*

3,94 g TRIS-HCl

7,5 ml Sodiumdodecylsulfate (20 %)

30 ml Glycerol

1 ml Mercaptoethanol

0,25 ml Bromphenolblau

*Sammelgelpuffer, pH 6,8*

2 g SDS

30,28 g TRIS

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

*Polyacrylamid-Sammelgel 4 %*

Aqua bidest.	4,7 ml
Sammelgelpuffer	1,8 ml
30 % Acrylamid	1 ml
TEMED	9 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	24 µl

*Trenngelpuffer, pH 8,8*

4 g SDS  
 181,72 g TRIS  
 mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

*Polyacrylamid-Trenngel 7,5 % bzw. 8 %*

	7,5 %	8 %
Aqua bidest.	8 ml	8,53 ml
Trenngelpuffer	4 ml	4 ml
30 % Acrylamid	4 ml	4,27 ml
TEMED	20 µl	20 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	80 µl	80 µl

*Elektrophorese-Puffer*

30,3 g TRIS  
 144 g Glycin  
 10 g SDS  
 mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

*Blot-Puffer*

3,03 g TRIS  
 11,25 g Glycin  
 100 ml Methanol  
 mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

*TBS 10x (Tris-gepufferte Salzlösung)*

500 ml Tris-HCl

87 g Natriumchlorid

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

*TBS-T (TBS-Tween), pH 7,6*

200 ml TBS 10x

2 ml Tween®20

mit Aqua bidest. auf 1800 ml auffüllen

### **4.1.3 Immunhistochemie**

*Citrat-Puffer-Stammlösung A (0,1 M)*

21,01 g Zitronensäure

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

*Citrat-Puffer-Stammlösung B (0,1 M)*

29,41 g Natriumcitrat

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

*Citrat-Puffer (0,01 M), pH 6,0*

18 ml Stammlösung A

82 ml Stammlösung B

900 ml Aqua bidest.

pH-Einstellung mittels 2N Natronlauge

*Ammoniakwasser*

1,4 ml 25 %iger Ammoniak

auf 250 ml Aqua bidest.



*Mowiol*

6 g Glycerin

2,4 g Mowiol 4-88

6 ml Aqua bidest.

12 ml Tris-HCl (pH 8,5)

25 mg/ml Lösung DABCO

## **4.2 Immunzytochemie**

Die immunzytochemischen Versuche erfolgten zur Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers UMB4 30-5. Es wurde überprüft, ob der Antikörper die humanen SST5-Rezeptoren (hSSTR5) in stabil transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen der Zelllinie HEK-293 (im Folgenden HEK) darstellt und ob eine Kreuzreaktivität zu anderen Zellbestandteilen auftritt. Des Weiteren wurde eine Kreuzreaktivität mit dem SSTR2 mit Hilfe von stabil transfizierten HEK-SSTR2-Zellen geprüft.

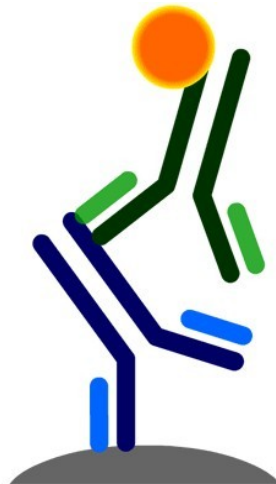
### **4.2.1 Kultivierung von HEK-Zellen**

Die Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293, bereitgestellt vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, wurden mit Lipofectamin 2000® nach Herstellerangaben zum einen mit hSSTR5-DNA und zum anderen mit hSSTR2-DNA stabil transfiziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen in DMEM(+)-Medium (mit 400 µg/ml G418, Geneticin®) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator.

### **4.2.2 Durchführung**

Für die immunzytochemischen Experimente wurden stabil transfizierte HEK-hSSTR5- und HEK-SSTR2-Zellen verwendet. Die Zellen wurden auf eine 24-Well-Zellkulturplatte mit Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern zu je 50-75.000 Zellen pro Well aufgeteilt. Über Nacht wurden sie bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und konnten anwachsen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 30-40 min mit Zamboni-Fixierlösung bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierlösung wurde durch mehrmaliges Waschen mit TPBS (ohne Thiomersal) entfernt. Danach wurden die Zellen mit eiskaltem 50 %igem und 100 %igem Methanol permeabilisiert, um die Antigenstruktur für den Primärantikörper

erreichbar zu machen. Nach vollständigem Entfernen des Alkohols wurden unspezifische Bindungsstellen mit PBS, versetzt mit 3 % Ziegenserum, eine Stunde lang blockiert. Dann wurden als Primärantikörper der monoklonale Kaninchen-Antikörper UMB4 30-5 in einer Verdünnung 1:100 beziehungsweise der monoklonale Kaninchen-Antikörper UMB1 97-1 in einer Verdünnung von 1:50 auf die HEK-hSSTR5- und HEK-SSTR2-Zellen aufgetragen und die Zellkulturplatten über Nacht bei 4°C auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 wurde eingesetzt, um den hSSTR5 zu detektieren und der Antikörper UMB1 97-1, um den SSTR2 nachzuweisen (Abb. 8). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Verdünnungsgrad des UMB4 30-5 von 1:100 ist sowohl im Vergleich zu dem des UMB1 97-1 (1:50) als auch zu den in anderen immunzytochemischen Färbungen mit ähnlichen monoklonalen Antikörpern eingesetzten Verdünnungen als üblich einzustufen (Fischer et al. 2008). Die kann als Hinweis auf eine ausreichend hohe Sensitivität des Antikörpers angesehen werden. Nach dem Abwaschen unspezifisch oder nicht gebundener Primärantikörper mit PBS wurde der Alexa-488-gekoppelte Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 als Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben (Abb. 8) und diese lichtgeschützt für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die nicht oder unspezifisch gebundenen Sekundärantikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Die Deckgläser mit den gefärbten Zellen wurden mit FluoromountG auf Objektträgern fixiert und im Weiteren bei 4°C lichtgeschützt gelagert.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz. Blau dargestellt ist der Primärantikörper, der das Zielantigen detektiert. In dieser Arbeit wurden die monoklonalen Kaninchen-Antikörper UMB4 30-5 und UMB1 97-1 als Primärantikörper eingesetzt. Grün dargestellt ist der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper, der den Primärantikörper Spezies-spezifisch bindet. Verwendet wurde hier der Alexa-488-gekoppelte Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper. Über die Fluoreszenz kann somit indirekt die Position der Primärantikörper und somit auch die des gesuchten Antigens detektiert werden ([www.univie.ac.at/mikroskopie/3\\_fluoreszenz/fluorochrome/4c\\_indirekteIF.htm](http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluorochrome/4c_indirekteIF.htm)).

### **4.3 Rezeptorisolation und Nachweis der Somatostatin-5- und Somatostatin-2-Rezeptoren mittels Immunpräzipitation**

Zur weiteren Charakterisierung des monoklonalen Kaninchen-Antikörpers UMB4 30-5 wurden Western-Blot-Analysen an stabil transfizierten HEK-hSSTR5-Zellen, HEK-SSTR2-Zellen und frischen humanen neuroendokrinem Tumorgewebe des Magen-Darm-Trakts (T1-T4), bereitgestellt von der Zentralklinik Bad Berka GmbH, durchgeführt. Nach Aufbereitung der Zellen und Gewebe wurden die Rezeptorproteine mit Hilfe von WGA-Beads isoliert, durch eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 wurde eingesetzt, um den hSSTR5 zu detektieren und der Antikörper UMB1 97-1, um den SSTR2 nachzuweisen. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex konnte durch die Zugabe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

#### **4.3.1 Aufbereitung der Zellen**

Aus stabil transfizierten HEK-hSSTR5-Zellen und HEK-SSTR2-Zellen wurden durch die im Folgenden beschriebenen Schritte Membranrezeptorproteine isoliert, um diese darauffolgend im Western-Blot zu untersuchen.

Die HEK-hSSTR5-Zellen und HEK-SSTR2-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS wurden zum Lysieren 800 µl Radioimmunpräzipitations-Puffer (RIPA-Puffer) mit Protease-Inhibitoren und Phosphatasehemmern (Complete-Mini®, PHOSStop®; Roche, Mannheim, Deutschland) für 10 Minuten auf die eisgekühlten Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus den Schalen gelöst und das Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4°C für 30 Minuten geschüttelt, um eine vollständige Lyse zu gewährleisten und dann bei 14000 g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Die hSSTR5- und SSTR2-Rezeptorproteine lagen nun mit weiteren Proteinen aus dem Zelllysate im Überstand vor.

#### **4.3.2 Aufbereitung des Gewebes**

Durch die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden aus vier verschiedenen humanen neuroendokrinen Tumorgewebeproben Rezeptorproteine isoliert, die anschließend im Western-Blot aufgetrennt wurden.

Das humane neuroendokrine Tumorgewebe wurde kurz nach der chirurgischen Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um enzymatische Abbauvorgänge zu verhindern. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Gewebeproben mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert und in Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend wurde jede Probe mit 500 µl RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren, Phosphatasehemmern (Complete-Mini®, PHOSStop®; Roche, Mannheim, Deutschland) und Pepstatin versetzt und mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators im Eisbad homogenisiert. Die Gewebeproben wurden anschließend für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Zur weiteren Auftrennung der Gewebebestandteile wurden die Proben ein weiteres Mal mit dem Ultraschallstab homogenisiert, mit 600 µl RIPA-Puffer-Inhibitoren-Gemisch aufgefüllt und für weitere 4 Stunden bei 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden Zell- und Gewebebestandteile durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 16000 rpm abgetrennt. Im Überstand lagen nun gelöste Proteine, unter ihnen auch die hSSTR5- und SSTR2-Rezeptorproteine, vor. Dieser Überstand wurde zur Rezeptorisolation weiterverwendet.

#### **4.3.3 Isolierung der Membranproteine mittels Weizenkeimlecithin**

Zur Isolierung der hSSTR5- und SST2-Rezeptorproteine mit Hilfe von Weizenkeimlecithin-Agarose-Kügelchen (WGA-Beads) nutzt man die Glykosylierungsstellen, welche bei den meisten Membranproteinen vorkommen. Über diese binden die Rezeptorproteine an die WGA-Beads und können so isoliert werden.

Die Überstände aus der Aufbereitung der Zellen und der Gewebe (siehe Kapitel 4.3.1 und 4.3.2) wurden auf 40 µl WGA-Beads gegeben und für 2 Stunden bei 4°C invertiert. Die entstandenen Membranprotein-WGA-Aggregate wurden zur Sedimentation bei 4°C kurz anzentrifugiert und anschließend dreimal mit 800 µl eiskaltem RIPA-Puffer ohne Inhibitorzusatz gewaschen. Nach dem Waschen befanden sich nur noch die an den WGA-Beads gebundenen Membranproteine in den Ansätzen. Anschließend wurden die gereinigten Aggregate mit 1xSDS-Probenpuffer versetzt. Die Rezeptor-WGA-Aggregate aus den HEK-hSSTR5- und HEK-SSTR2-Zellen wurden mit 75 µl, die Aggregate aus den verarbeiteten Geweben mit 50 µl SDS-Probenpuffer bei 60°C für 20 min inkubiert. Die starken

Denaturierungseigenschaften von SDS (sodium dodecyl sulfate) wurden hierbei genutzt, um die aufgereinigten Rezeptorproteine aus den WGA-Beads zu lösen. Nach der Inkubation wurden die WGA-Beads durch Zentrifugation bei 16000 rpm abgetrennt. Der Überstand mit den gelösten hSSTR5- und SSTR2-Proteinen wurde anschließend für die elektrophoretische Proteinauftrennung weiterverwendet.

#### **4.3.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (kurz SDS-PAGE) mit Tris-Glycin-Puffer durchgeführt. SDS wirkt als Detergens, es überdeckt zum einen die Eigenladung der Proteine und führt zu einer konstanten negativen Ladungsverteilung im SDS-Protein-Komplex. Zum anderen denaturiert SDS während der Inkubation bei 60°C die Proteine und führt somit zum Aufheben der Proteinstruktur. Im SDS-Protein-Komplex kommt es somit vor allem zu einer Unterscheidung anhand der Größe der einzelnen Proteine. Das Polyacrylamid-Gel wirkt wie ein Molekularsieb und trennt die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht auf (Rehm und Letzel 2010).

Für die Elektrophorese der SDS-Protein-Komplexe wurde bei allen Ansätzen ein 4 %iges Sammelgel genutzt. Als Trenngel wurde für die Proteine aus den aufbereiteten HEK-hSSTR5- und HEK-SSTR2-Zellen ein 7,5 %iges Polyacrylamidgel, für die Proteine aus den humanen Tumorgeweben ein 8 %iges Gel verwendet. In die Taschen des Sammelgels wurden 20 µl der Proben und zur späteren Größenabschätzung der Proteine ein Molekulargewichtsmarker (Prestained PageRuler®; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 130 V angelegt, bis die sichtbare Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

#### **4.3.5 Western-Blot**

Die Gele wurden in einer Blotkammer (Trans-Blot® SD Semi-Dry; Bio-Rad, München, Deutschland) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Dafür wurden die Gele mit den aufgetrennten Proteinen nach der SDS-PAGE für 10 min in Blot-Puffer vorinkubiert und die PVDF-Membran für 5 min in 100 %igem Methanol aktiviert. In der Transferzelle wurde die Membran, das Gel und in Blot-Puffer getränktes Blot-Papier nach einer festgelegten Reihenfolge möglichst luftblasenfrei angeordnet. Auf die Anode wurde nach einer Lage Blot-Papier die PVDF-Membran, direkt darüber das Polyacrylamidgel und

abschließend eine weitere Lage Blot-Papier geschichtet. Nach Anlegen der Kathode erfolgte das Blotten der Proteine auf die Membran bei 250 mA innerhalb von 60 min.

#### **4.3.6 Nachweis der Proteine**

Nach der Übertragung der Proteine auf die Membran wurde diese für 30 min in 5 %igem Magermilchpulver-TBS-T-Gemisch (MMP-TBS-T) geschwenkt, um die unspezifischen Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Die Membranen wurden zur Detektion der hSSTR5- und SSTR2-Rezeptoren jeweils getrennt mit den monoklonalen Antikörpern UMB4 30-5 und UMB1 97-1 in einer Verdünnung von 1:200 in 5 %igem MMP-TBS-T inkubiert. Diese Inkubation erfolgte für 12-14 Stunden bei 4°C auf einem Orbitalschüttler. Wie schon bei den immunzytochemischen Untersuchungen handelt es sich bei dem hier verwendeten Verdünnungsgrad des UMB4 30-5 von 1:200 um einen üblichen Wert, wie er auch bei ähnlichen Analysen mit vergleichbaren monoklonalen Antikörpern eingesetzt wird (Fischer et al. 2008).

Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen für 2 Stunden mit dem Sekundärantikörper auf dem Orbitalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Anti-Kaninchen-Antikörper IgG-HRP-sc-2004 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA) in einer Verdünnung von 1:5000 in 5 %igem MMP-TBS-T verwendet. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS-T, um ungebundene Antikörper abzuspülen, wurde der Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz auf einem entsprechenden Röntgenfilm sichtbar gemacht. Hierbei katalysierte die am Sekundärantikörper gebundene Peroxidase, nach Zugabe der Reagenzien Wasserstoffperoxid und Luminol, eine Lichtreaktion. Diese Chemilumineszenz führt zur Belichtung eines Chemilumineszenz-sensitiven Röntgenfilms entsprechend der Stärke und Position der durch die Primärantikörper detektierten Banden.

#### **4.3.7 Präabsorption**

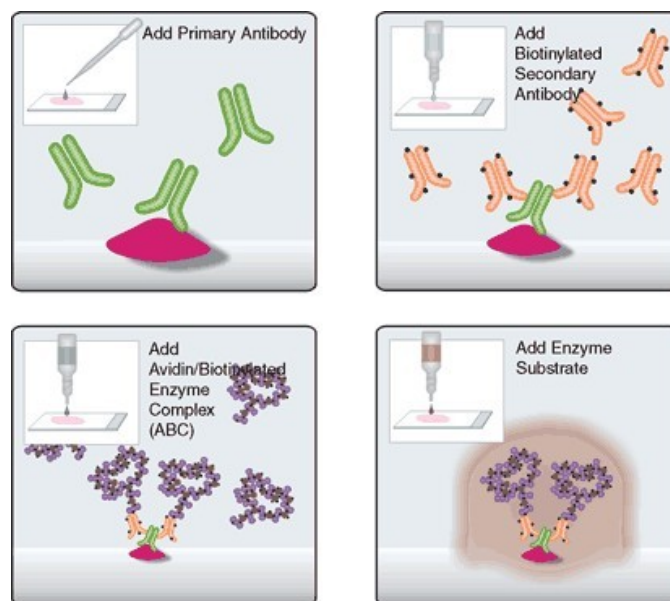
Die Präabsorptionskontrolle diente dem Spezifitätsnachweis des monoklonalen Anti-hSSTR5-Antikörpers UMB4 30-5. Hierbei wurde der Antikörper mit dem Peptid inkubiert, das zur Generierung des Antikörpers verwendet worden war, bestehend aus den Aminosäuren 344 bis 364 des carboxyterminalen Endes des hSSTR5 (QEATPPAHRAAANGLMQTSKL).

Der Antikörper bindet hierbei sein spezifisches Antigen und kann somit nicht mehr mit den entsprechenden Gewebeantigenen reagieren (Burry 2011).

Die Inkubation des Antikörpers erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 10 µg/ml des Peptids und einer Verdünnung des Antikörpers UMB4 30-5 von 1:100 in 5 %igem MMP-TBS-T. Die Präabsorptionskontrolle wurde wie in Kapitel 4.3.6 beschrieben an den aufgetrennten Gewebeproteinen aus den humanen neuroendokrinen Tumorgeweben durchgeführt, nur dass hier das Peptid-Antikörper-Gemisch anstelle des alleinigen Antikörpers UMB4 30-5 auf die Membranen gegeben wurde.

#### 4.4 Immunhistochemie

Um den hSSTR5 und den SSTR2 mittels Immunhistochemie in den Gewebeschnitten nachzuweisen, wurde die Streptavidin-Biotin-Methode angewendet (Abb. 9).



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin-Methode ([www.vectorlabs.com/catalog.aspx?dpID=4&locID=152](http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?dpID=4&locID=152))

Als Primärantikörper wurde bei dieser Methode zum Nachweis des hSSTR5 der monoklonale Kaninchen-Antikörper UMB4 30-5 und zur Detektion des SSTR2 der monoklonale Kaninchen-Antikörper UMB1 97-1 jeweils in einer Verdünnung von 1:10 verwendet, dies entspricht einem üblichen Verdünnungsgrad bei vergleichbaren monoklonalen Antikörpern (Fischer et al. 2008). Als Sekundärantikörper wurde ein Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20, der den Primärantikörper artspezifisch bindet und kovalent an Biotin gekoppelt ist, eingesetzt. Anschließend wurde der Gewebeschnitt mit Peroxidase-

gekoppeltem Streptavidin (Verdünnung 1:20) inkubiert, welches mit großer Affinität am Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Hinzugegebenes Chromogen wurde von der im Komplex gebundenen Peroxidase umgesetzt. Die dadurch entstandene Rotfärbung zeigt somit indirekt die Lokalisation der Rezeptoren an.

#### **4.4.1 Präparate**

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden in Formalin fixierte und in Paraffinblöcken eingebettete Organproben von den Instituten für Pathologie der Universitätsklinik Jena, der Charité-Universitätsmedizin Berlin und der Universitätsklinik Magdeburg zur Verfügung gestellt. Von diesen Blöcken wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Microm, Walldorf, Deutschland) 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger überführt und luftgetrocknet. Verwendet wurden Präparate folgender Tumorarten: Hypophysenadenome (n = 30; davon Wachstumshormon (GH)-produzierende Adenome, n = 25; kortikotrope (ACTH-produzierende) Adenome, n = 5), duktile Adenokarzinome des Pankreas (n = 5), klarzellige Nierenzellkarzinome (n = 11), Phäochromozytome (n = 11), neuroendokrine Tumore der Lunge (n = 4), neuroendokrine Tumore des Magen-Darm-Trakts (n = 33), Lymphknoten-Metastasen (n = 12) und Leber-Metastasen neuroendokriner Tumore (n = 12), Insulinome des Pankreas (n = 14), Adenokarzinome der Prostata (n = 9), Mammakarzinome (n = 10), Plattenepithelkarzinome der Zervix uteri (n = 8) und Ovarialkarzinome (n = 11). Tumorfremie Gewebeschnitte aus der Hypophyse, dem Pankreas, verschiedenen Darm-Abschnitten, der Niere, der Nebenniere, der Leber, der Lunge, der Prostata, der Mamma, der Zervix uteri, den Ovarien und von Lymphknoten wurden in vergleichbarer Anzahl ebenfalls gefärbt.



#### 4.4.2 Durchführung

Die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte laut dem in Tabelle 3 dargestellten Protokoll.

**Tabelle 3:** Protokoll der immunhistochemischen Färbungen an Paraffinschnitten (AK = Antikörper).

Arbeitsschritte	Lösungen	Mengen [μl]	Inkubationszeit [min]
1. Für den nachfolgenden Schritt werden alle Objektträger in Glas-Färbeküvetten einsortiert.			
2. Entparaffinieren	Xylol		20
	Xylol		20
	Xylol		20
3. Xylol entfernen	100 % Ethanol		20
	100 % Ethanol		20
	100 % Ethanol		20
4. Blockierung der endogenen Peroxidase, um unspezifische Färbungen zu verhindern	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol		45
5. Rehydrierung der Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe	95 % Ethanol		2
	95 % Ethanol		2
	80 % Ethanol		2
	70 % Ethanol		2
	Aqua bidest.		5
	Aqua bidest.		5
6. Für den nachfolgenden Schritt werden alle Objektträger aus den Glas-Färbeküvetten in Citrat-Puffer-gefüllte Plastikkuvetten umsortiert.			

7.	Demaskierung der Antigene zur Verstärkung der Signalintensität	in Citrat-Puffer (0,01 M, pH 6,0), in der Mikrowelle bei 600 W		
		Kochen		8
		Abkühlen		4
		Kochen		4
		Abkühlen		4
		Kochen		4
8.	Im Anschluss ca. 30 min abkühlen lassen, bis der Citrat-Puffer eine in etwa handwarme Temperatur hat und dann für ca. 5 min in Aqua bidest. stellen.			
9.	pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes, um unspezifische Bindungen zu verhindern	PBS mit 1 % RSA		5
10.	Für die weiteren Schritte werden die Objektträger in Sequenza®-Färbesysteme einsortiert. Bei diesem System entsteht nach Einbringen der Präparate ein kapillärer Spalt, über welchen die weiteren Lösungen zugegeben werden.			
11.	pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes	PBS mit 1 % RSA	1500	
12.	Blockierung unspezifischer Bindungen, um Hintergrundfärbungen zu vermeiden	Ziegen-Serum (entspricht der Spezies des Sekundär-AK)	150	20
13.	Bindung des Antikörpers	UMB4 30-5 Kaninchen-AK/ UMB1 97-1 Kaninchen-AK	300	bei 4°C über Nacht
14.	zweimaliges Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen	PBS mit 1 % RSA	1500	
		PBS mit 1 % RSA	1500	

15.	Zugabe des Sekundär-Antikörpers	biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-AK	150	30
16.	Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen	PBS mit 1 % RSA	1500	
17.	Zugabe des enzymgekoppelten Komplexes, um die Farbreaktion zu ermöglichen	Streptavidin-Peroxidase-Komplex	150	30
18.	Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene Komplexe zu entfernen	PBS mit 1 % RSA	1500	
19.	Färben der Antikörper-gebundenen Bereiche durch Zugabe des Substratchromogens	AEC	150	15
		AEC	150	15
		(3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)		
20.	Waschen und damit Stoppen der Reaktion	Aqua bidest.	1500	
21.	Für die weitere Bearbeitung werden die Präparate aus dem Färbesystem in die Glas-Färbeküvetten zurücksortiert.			
22.	Waschen	Aqua bidest.		1
		Aqua bidest.		1
23.	Gegenfärbung der Zellkerne	Mayer's Hämatoxylin		50 sek
24.	Waschen	Aqua bidest.		2,5
25.	Hämatoxylin-Bläuung	Ammoniakwasser		5x eintauchen
26.	Waschen	Aqua bidest.		2,5
27.	Im Anschluss werden die Präparate mit Mowiol und mit Deckgläsern eingedeckt.			

#### **4.4.3 Peptidneutralisation**

Zusätzliche immunhistochemische Färbungen wurden nach Peptidneutralisation des monoklonalen Antikörpers UMB4 30-5 durchgeführt, um dessen Spezifität zu überprüfen. Verwendet wurde hierfür eine Reihe der zuvor mit dem UMB4 30-5 positiv gefärbten Gewebeschnitte, wie zum Beispiel Pankreata (positive gefärbte Langerhans-Inseln) und neuroendokrine Tumore.

Zur Neutralisation wurde auch hier das entsprechende Peptid, welches dem Kaninchen zur Produktion der Antikörper verabreicht worden war, eingesetzt (siehe Kapitel 4.3.7 und 4.6.1). Der Antikörper wurde, bevor er auf das Gewebe aufgetragen wurde, für zwei Stunden mit seinem Peptid in einer Konzentration von 10 µg/ml bei Raumtemperatur inkubiert. Durchgeführt wurde die Färbung nach dem Protokoll der Tabelle 3. Im 12. Schritt wurde jedoch anstelle des alleinigen Primärantikörpers das Peptid-UMB4-30-5-Gemisch verwendet.

#### **4.4.4 Doppel-Immunfluoreszenz**

Verwendet wurden hier Gewebsschnitte aus humanem Pankreas und humaner Hypophyse. Die Präparate wurden jeweils mit zwei Antikörpern behandelt, zum einen mit Antikörpern gegen den hSSTR5 beziehungsweise SSTR2 und zum anderen mit Antikörpern gegen ein gewebeeigenes Hormon.

Für den Nachweis der Somatostatin-Rezeptoren wurden die Antikörper UMB4 30-5 gegen den hSSTR5 und UMB1 97-1 gegen den SSTR2 verwendet, jeweils in einer Verdünnung von 1:10. Die Präparate der Bauspeicheldrüse wurden zusätzlich mit Antikörpern gegen humanes Insulin (Verdünnung 1:100) und mit Antikörpern gegen humanes Glukagon (Verdünnung 1:500) behandelt, die Schnitte der Hirnanhangsdrüse mit Antikörpern gegen humanes adrenocorticotropes Hormon (ACTH, Verdünnung 1:100) und Antikörpern gegen humanes Wachstumshormon (GH, Verdünnung 1:100).

Somit entstanden im Pankreas die Doppelfärbungen hSSTR5–Insulin, hSSTR5–Glukagon, SSTR2–Insulin und SSTR2–Glukagon und in der Hypophyse die Doppelmarkierungen hSSTR5–ACTH, hSSTR5–Wachstumshormon, SSTR2–ACTH und SSTR2–Wachstumshormon.

#### 4.4.4.1 Durchführung

Die Durchführung der Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgte bis zum 10. Schritt laut dem in Tabelle 3 dargestellten Protokoll und ab Schritt 11 weiter nach Tabelle 4.

**Tabelle 4:** Protokoll zum zweiten Teil der Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen.

Arbeitsschritte	Lösungen	Mengen [µl]	Inkubationszeit [min]
<b>11.</b> pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes, um unspezifische Bindungen zu verhindern	PBS mit 1 % RSA PBS mit 1 % RSA PBS mit 1 % RSA	1500 1500 1500	
<b>12.</b> Bindung der Antikörper			bei 4°C über Nacht
Pankreas	UMB4 30-5 Kaninchen-AK + Maus-Anti-Glukagon-AK <i>oder</i> UMB4 30-5 Kaninchen-AK + Maus-Anti-Insulin-AK <i>oder</i> UMB1 97-1 Kaninchen-AK + Maus-Anti-Glukagon-AK <i>oder</i> UMB1 97-1 Kaninchen-AK + Maus-Anti-Insulin-AK	300  300  300	
Hypophyse	UMB4 30-5 Kaninchen-AK + Maus-Anti-ACTH-AK <i>oder</i> UMB4 30-5 Kaninchen-AK + Maus-Anti-GH-AK <i>oder</i>	300  300  300	

	UMB1 97-1 Kaninchen-AK + Maus-Anti-ACTH-AK <i>oder</i> UMB1 97-1 Kaninchen-AK + Maus-Anti-GH-AK	300	
<b>13.</b>	zweimaliges Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen	PBS mit 1 % RSA PBS mit 1 % RSA	1500 1500
<b>14.</b>	Zugabe des ersten Sekundär-Antikörpers	Cy3-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-AK	300 150
<b>15.</b>	dreimaliges Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen	PBS mit 1 % RSA PBS mit 1 % RSA PBS mit 1 % RSA	1500 1500 1500
<b>16.</b>	Zugabe des zweiten Sekundär-Antikörpers	Alexa-488-gekoppelter Esel-Anti-Maus-AK	300 150
<b>17.</b>	dreimaliges Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen	PBS mit 1 % RSA PBS mit 1 % RSA Aqua bidest.	1500 1500 1500
<b>18.</b>	Für die weitere Bearbeitung werden die Präparate aus dem Färbesystem in die Glas-Färbeküvetten zurücksortiert.		
<b>19.</b>	Dehydrierung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe	70 % Ethanol 80 % Ethanol 90 % Ethanol 100 % Ethanol 100 % Ethanol	3 3 3 5 5
<b>20.</b>	Dehydrierung und Waschung	Xylol Xylol Xylol	5 5 5
<b>21.</b>	Im Anschluss werden die Präparate mit DePeX und mit Deckgläsern eingedeckt.		

#### 4.5 Auswertung

Die Beurteilung der immunzytochemischen Färbungen erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte erfolgte lichtmikroskopisch mittels eines Olympus DP 70-Kamera-Systems. Die Beurteilung erfolgte semiquantitativ anhand des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner (Remmele und Stegner 1987). Hierbei wurde sowohl die Intensität der Färbung als auch der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen im Gewebe berücksichtigt. Die Bewertungsscores der Färbeintensität und des Anteils positiv gefärbter Zellen sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner 1987.

Score	Färbeintensität	Anteil positiver Zellen
<b>0</b>	keine Färbereaktion	keine positiven Zellen
<b>1</b>	schwache Färbereaktion	<10 % positive Zellen
<b>2</b>	mäßig starke Färbereaktion	10-50 % positive Zellen
<b>3</b>	starke Färbereaktion	51-80 % positive Zellen
<b>4</b>	-	>80 % positive Zellen

Die Berechnung des IRS erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{IRS} = \text{Score (Färbeintensität)} \times \text{Score (Anteil positiver Zellen)}$$

Somit ergibt sich für die immunhistochemischen Färbungen ein IRS im Wert zwischen 0 und 12.

## 4.6 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und verwendete Substanzen

### 4.6.1 Antikörper

#### *UMB4 30-5*

monoklonaler Kaninchen-Anti-hSSTR5-Antikörper

C-terminale antigene Sequenz: QEATPPAHRAAANGLMQTSKL

(Aminosäuren 344-364 des hSSTR5)

Epitomics, Burlingame, Kalifornien, USA

#### *UMB1 97-1*

monoklonaler Kaninchen-Anti-SST2A-Antikörper

Epitomics, Burlingame, Kalifornien, USA

#### *Anti-ACTH-Antikörper*

monoklonaler Maus-Anti-Adrenokortikotropes-Hormon-Antikörper

Primärantikörper für Doppel-Immunfluoreszenz

Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland

#### *Anti-GH-Antikörper*

monoklonaler Maus-Anti-Growth-Hormon-Antikörper

Primärantikörper für Doppel-Immunfluoreszenz

Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA

#### *Anti-Glukagon-Antikörper*

monoklonaler Maus-Anti-Glukagon-Antikörper

Primärantikörper für Doppel-Immunfluoreszenz

Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA

#### *Anti-Insulin-Antikörper*

monoklonaler Maus-Anti-Insulin-Antikörper (ab7760)

Primärantikörper für Doppel-Immunfluoreszenz

Abcam, Cambridge, UK



*Alexa-488-Anti-Kaninchen-Antikörper*

Alexa-488-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper  
 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz  
 Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

*Alexa-488-Anti-Maus-Antikörper*

Alexa-488-gekoppelter Esel-Anti-Maus-Antikörper  
 Sekundärantikörper für Doppel-Immunfluoreszenz  
 Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

*Cy3-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper*

Cy<sup>TM</sup>3-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper  
 Sekundärantikörper für Doppel-Immunfluoreszenz  
 Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK

*IgG-HRP sc-2004*

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper  
 Sekundärantikörper für Chemilumineszenz nach Western-Blot  
 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA

#### 4.6.2 Laborgeräte und Labormaterialien

- |   |  |
|---|--|
| - Blotkammer Trans-Blot® SD Semi-Dry<br>Electrophoretic Transfer Cell | Bio-Rad, München, Deutschland                    |
| - Blot-Papier   | Bio-Rad, München, Deutschland                    |
| - Brutschrank HERAcell® 240   | Heraeus, Hanau, Deutschland                      |
| - Deckgläser  | Menzel-Gläser, Braunschweig,<br>Deutschland      |
| - Entwicklungsmaschine AGFA Curix 60                                  | Agfa-Gevaert AG, Morstel, Belgien                |
| - Eppendorf-Gefäße  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                  |
| - Filmkassette Amersham Hypercassette™                                | Amersham Biosciences, Freiburg,<br>Deutschland   |
| - Fuji SuperRX Safelight Glass 13x18<br>- medizinischer Röntgenfilm   | Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf,<br>Deutschland |

---

- Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Leica Jung-Histokinette 2000	Leica, Solms, Deutschland
- LSM 510 META Laser-Scanning-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
- Magnetrührer	Schott Instruments GmbH, Mainz, Deutschland
- Mikroskop Axio Imager A1	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
- Mikrowelle CB 1271	Bomann, Kempen, Deutschland
- Multiwell Kulturplatte	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
- Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
- Olympus-DP-70-Kamera-System	Olympus America Inc., Center Valley, Pennsylvania, USA
- Paraffin-Gieß-Automat EG 1110	Leica, Solms, Deutschland
- Petrischalen Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
- pH-Labormessgerät pH 211	Hanna Instruments, Kehl, Deutschland
- Proteingelkammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
- Rotationsmikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf, Deutschland
- Schüttelgerät Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
- Schüttelwasserbad SW27	Julabo, Seelbach, Deutschland
- Sequenza®-Färbesystem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Ultraschall-Homogenisator Sonifier 450	Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
- Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
- Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
- Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge Biofuge 28RS	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

### 4.6.3 Immunzytochemie und Immunhistochemie

- AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)	BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA
- Ammoniak	Merck, Darmstadt, Deutschland
- antigenes Peptid hSSTR5 QEATPPAHRAAANGLMQTSKL	Epitomics, Burlingame, Kalifornien, USA
- antigenes Peptid SSTR2 ETQRTLNGDLQTSI	Epitomics, Burlingame, Kalifornien, USA
- Citratpuffer-Bestandteile	Merck, Darmstadt, Deutschland
- DABCO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- DePeX	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- DMEM	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
- Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
- FluoromountG™	SouthernBiotech, Birmingham, UK
- G418, Geneticin®	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Lipofectamin 2000®	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- Mayer's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Paraformaldehyd	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
- Pen-Strep (Penicillin, Streptomycin)	Lonza, Walkersville, Maryland, USA
- Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Rinderserumalbumin (RSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Salze für PBS-Puffer	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Thiomersal	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- VECTASTAIN® Elite ABC kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA
- Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

#### 4.6.4 Western-Blot-Analysen

- Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Bromphenolblau	Bio-Rad, München, Deutschland
- Complete-mini® EDTA-free	Roche, Mannheim, Deutschland
- EDTA	Roche, Mannheim, Deutschland
- Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Igepal	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Luminol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Magermilchpulver	Sucotin, Jena, Deutschland
- Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Molekulargewichtsmarker (Prestained PageRuler)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
- Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- p-Cumarsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Pepstatin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- PhosSTOP®	Roche, Mannheim, Deutschland
- Roti®-PVDF-Membran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- SDS-Lösung 20 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Tween®20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- WGA-Beads - Lectin, immobilisiert auf Agarose CL-4B von Triticum vulgaris	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## 5 Ergebnisse

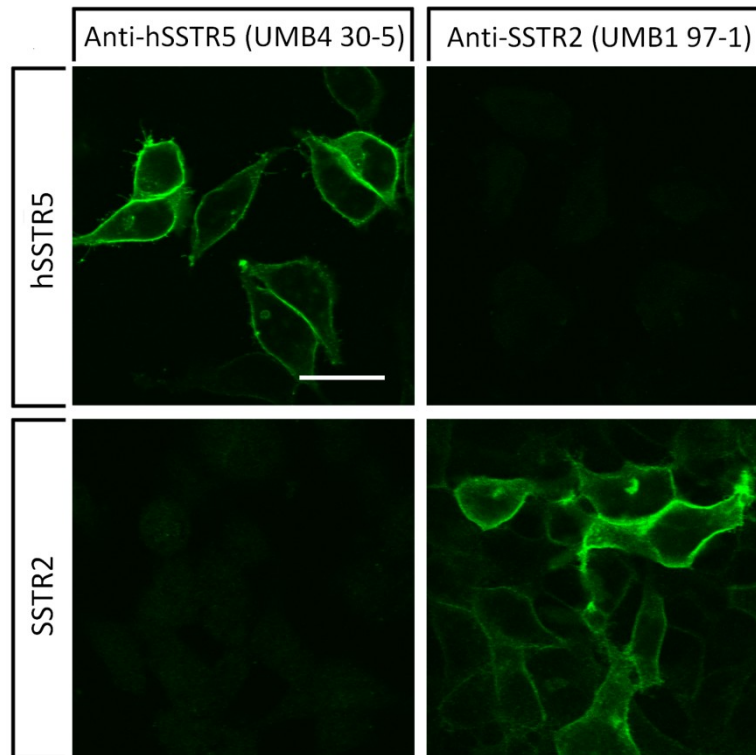
Zur Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers UMB4 30-5 wurden Western-Blot-Analysen, immunzytochemische und immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Ziel war, die Spezifität des Antikörpers gegenüber seinem Antigen, dem humanen Somatostatin-Rezeptor 5, zu ermitteln und das Expressionsmuster des Somatostatin-Rezeptors in verschiedenen humanen Normal- und Tumorgeweben zu bestimmen.

Um einen Vergleich zum Expressionsmuster des Somatostatin-Rezeptors 2 herstellen zu können, wurde in den Versuchen parallel der monoklonale Antikörper UMB1 97-1 eingesetzt, welcher bereits ausführlich charakterisiert wurde (Fischer et al. 2008).

### 5.1 Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen

Die immunzytochemische Charakterisierung erfolgte an stabil transfizierten HEK-hSSTR5- und HEK-SSTR2-Zellen mit Hilfe der monoklonalen Antikörper UMB4 30-5 (Verdünnung 1:100) und UMB1 97-1 (Verdünnung 1:100).

Bei der Färbung der HEK-hSSTR5-Zellen mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 zeigte sich eine starke membranständige Immunfluoreszenz und eine geringere intrazelluläre perinukleäre Färbung. Wurden diese Zellen hingegen unter denselben Bedingungen mit dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 inkubiert, war keine Färbung sichtbar (Abb. 10, obere Zeile). Im Gegensatz dazu war bei der immunzytochemischen Färbung der HEK-SSTR2-Zellen eine membranständige Immunfluoreszenz nur zu sehen, wenn der Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 genutzt wurde. Beim Einsatz des Anti-hSSTR5-Antikörpers UMB4 30-5 kam es zu keiner sichtbaren Färbung (Abb. 10, untere Zeile).



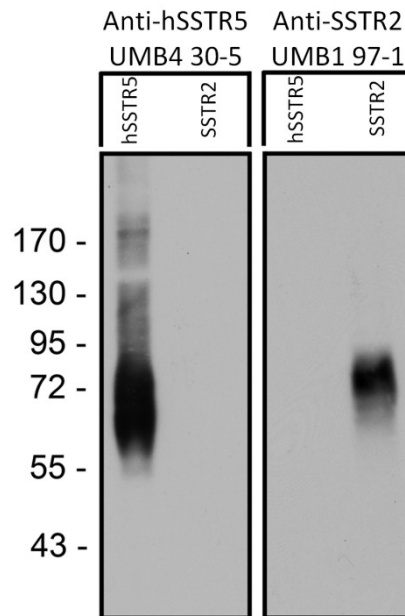
**Abb. 10:** Immunzytochemie an HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden zur Darstellung des humanen SSTR5 (obere Zeile) oder des humanen SSTR2 (untere Zeile) mit dem entsprechenden Rezeptor stabil transfiziert und entweder mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (links) oder dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (rechts) als Primärantikörper und einem Alexa-488-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper als Sekundärantikörper inkubiert. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

## 5.2 Western-Blot-Analysen

### 5.2.1 Western-Blot-Analysen an HEK-293-Zellen

Zum Nachweis der Spezifität des UMB4 30-5 wurden Western-Blot-Analysen an stabil transfizierten HEK-hSSTR5- und HEK-SSTR2-Zellen vorgenommen. Die Rezeptorproteine wurden mittels WGA-Beads isoliert, durch eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet.

Der Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (Verdünnung 1:100) detektierte eine breite Bande zwischen 55 und 70 kDa bei den HEK-hSSTR5-Zellen, während sich bei den HEK-SSTR2-Zellen kein Signal zeigte. Im Gegensatz dazu wies der Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (Verdünnung 1:100) bei den HEK-SSTR2-Zellen eine breite Bande bei 70 – 80 kDa nach, zeigte aber kein Signal bei den HEK-hSSTR5-Zellen (Abb. 11).



**Abb. 11:** Western-Blot-Analysen an HEK-293-Zellen, stabil transfiziert mit dem hSSTR5 oder dem SSTR2, zum einen mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (links) und zum anderen mit dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (rechts). Als Skala diente der Protein-Molekulargewichtsmarker (MG in kDa). Der UMB4 30-5 detektierte eine breite Bande bei 55 - 70 kDa bei den HEK-hSSTR5-Zellen, der UMB1 97-1 ein entsprechendes Signal bei 70 - 80 kDa bei den HEK-SSTR2-Zellen.

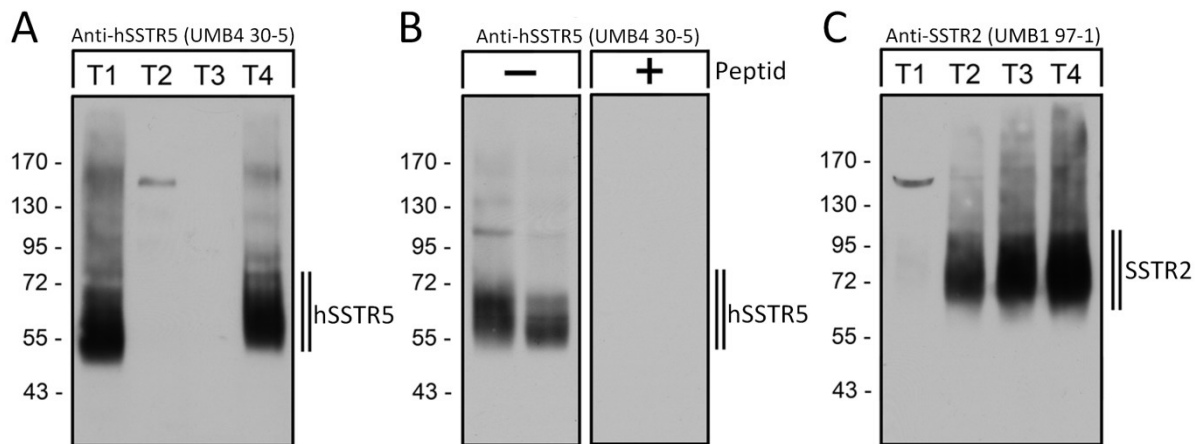
### 5.2.2 Western-Blot-Analysen an humanem neuroendokrinem Tumorgewebe

Um die Spezifität des UMB4 30-5 weiter zu charakterisieren, wurden Western-Blot-Analysen an Gewebeproben von vier verschiedenen humanen neuroendokrinen Tumoren des Magen-Darm-Trakts (T1-T4) durchgeführt. Hier konnte getestet werden, ob der UMB4 30-5 eine mögliche Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen in humanen Geweben aufzeigt.

Nach Homogenisierung des Gewebes wurden die Rezeptorproteine mit Hilfe von WGA-Beads isoliert, durch eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (Verdünnung 1:100) detektierte eine breite Bande zwischen 55 und 70 kDa in den Tumoren T1 und T4 (Abb. 12A). Hingegen wies der Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (Verdünnung 1:100) unter identischen Bedingungen ein breites Signal zwischen 70 und 80 kDa in den Tumoren T2, T3, und T4 nach (Abb. 12C).

Zum weiteren Spezifitätsnachweis des UMB4 30-5 wurde parallel eine Präabsorptionskontrolle mittels Peptidneutralisation durchgeführt. Hierzu wurde der Antikörper mit seinem antigenen Peptid (10 µg/ml) für zwei Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Banden, die der Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 in den Tumoren T1

und T4 detektiert hatte, waren nach Präabsorption des Antikörpers nicht mehr sichtbar (Abb. 12B).



**Abb. 12:** Western-Blot-Analysen an 4 humanen neuroendokrinen Tumoren des Magen-Darm-Trakts (T1-T4) mit dem Antikörper UMB4 30-5 (**A**, **B**) und dem Antikörper UMB1 97-1 (**C**). Als Skala diente der Protein-Molekulargewichtsmarker (MG in kDa). Der UMB4 30-5 detektierte eine breite Bande bei 55 - 70 kDa in den Tumoren T1 und T4, der UMB1 97-1 ein breites Signal bei 70 - 80 kDa in den Tumoren T2, T3 und T4. **B** Für die Präabsorptionskontrolle wurde der Antikörper UMB4 30-5 für 2 Stunden mit seinem antigenen Peptid (10 µg/ml) vorinkubiert. Hier zeigte sich keine Bande.

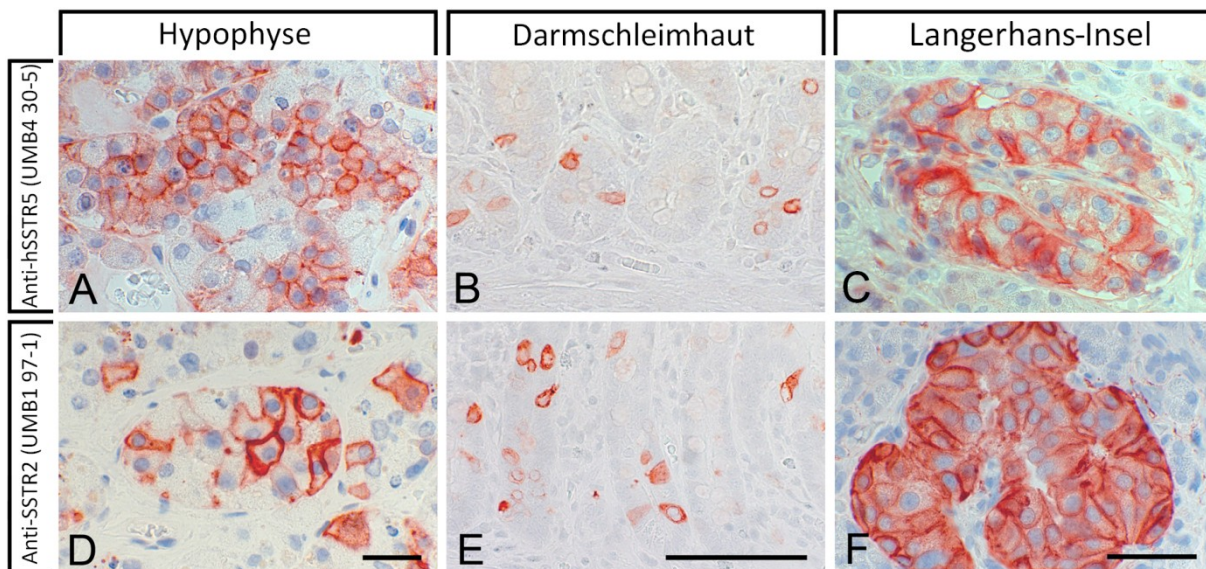
### 5.3 Immunhistochemie

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB4 30-5 wurden Paraffinschnitte von verschiedenen menschlichen tumorfreien und neoplastischen Geweben auf das Vorhandensein und auf die Lokalisation des hSSTR5 untersucht. Zur Kontrolle der Spezifität der Färbung mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 wurden zusätzlich Färbungen nach Peptidneutralisation durchgeführt. Parallel dazu wurden die Gewebeschnitte mit dem Antikörper UMB1 97-1 gefärbt, um das SSTR2-Expressionsmuster im Vergleich darzustellen. Die Präparate wurden entparaffiniert und entfettet, in Citrat-Puffer gekocht und mit dem UMB4 30-5 (Verdünnung 1:10) bzw. mit dem UMB1 97-1 (Verdünnung 1:10) zur immunhistochemischen Färbung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20) und dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Durch die Reaktion des Peroxidase-Komplexes mit dem Chromogen AEC entstand an den detektierten Stellen eine Rotfärbung. Die Auswertung der Färbung erfolgte semiquantitativ nach dem Immunreaktiven Score (IRS) (siehe Kapitel 4.5), in Abhängigkeit von der Intensität der Färbung und dem prozentualen Anteil der gefärbten Zellen im Gewebe.



### 5.3.1 Immunhistochemische Untersuchungen an humanem Normalgewebe

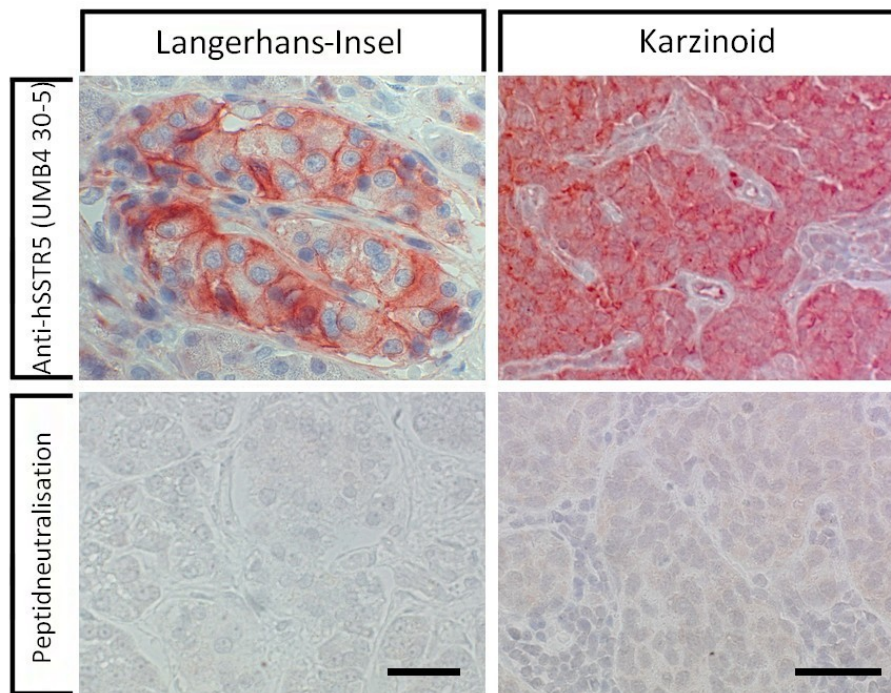
Die immunhistochemischen Färbungen wurden an tumorfreien Gewebeschnitten aus der Hypophyse, dem Pankreas, verschiedenen Darm-Abschnitten, der Niere, der Nebenniere, der Leber, der Lunge, der Prostata, der Mamma, der Zervix uteri, den Ovarien und an Lymphknoten durchgeführt. Sowohl der Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 als auch der Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 führten zu einer kräftigen, vorwiegend membranständigen Immunfärbung. Im Hypophysenvorderlappen färbten sowohl der UMB4 30-5 als auch der UMB1 97-1 eine Vielzahl von Zellen kräftig an (Abb. 13). Um die Färbungen präziser den einzelnen Hormon-produzierenden Zellsubtypen zuordnen zu können, wurden weiterführende Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt; siehe Kapitel 5.3.2. In der Darmschleimhaut detektierten beide Antikörper vereinzelte Zellen mit starker membranständiger Immunfärbung, diese entsprechen am ehesten den neuroendokrinen Zellen des Darms (Abb. 13). In den Langerhans-Inseln des Pankreas zeigten viele Zellen eine erhebliche Immunfärbung, sowohl durch den Antikörper UMB4 30-5 als auch durch den Antikörper UMB1 97-1 (Abb. 13). Zur Differenzierung der hSSTR5- beziehungsweise SSTR2-positiven Zellen im Inselapparat wurden ebenfalls weiterführende Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt; siehe Kapitel 5.3.3.



**Abb. 13:** Immunhistochemische Färbungen an humanem Normalgewebe mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (A-C) und dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (D-F) (rotbraune Farbe). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Bei der Immunhistochemie zeigte sich eine kräftige, vorwiegend membranständige Immunfärbung sowohl bei den hSSTR5-positiven als auch bei den SSTR2-positiven Zellen. Maßstabsbalken: A = D = 50  $\mu$ m, B = E = 500  $\mu$ m, C = F = 100  $\mu$ m.

Des Weiteren kam es zu einer Immunfärbung in der Niere durch den UMB4 30-5 an der Zellmembran der Endothelzellen in den glomerulären Kapillaren. In den Podozyten, den Mesangiumzellen, der Bowman-Kapsel und den Tubuli zeigte sich jedoch keine Immunfärbung. Die Färbungen durch den UMB1 97-1 führten nicht zu einer positiven Immunreaktion an den glomerulären Kapillaren. Vereinzelt wurden aber Zellen im Interstitium des Nierengewebes gefärbt, vermutlich Erythropoetin-produzierende Fibroblasten. In den Nebennieren kam es durch den Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 zu keiner wesentlichen Immunfärbung. Durch den UMB1 97-1 zeigte sich jedoch eine starke Markierung des Nebennierenmarks. Stark hSSTR5-positive Färbungen konnten auch in Myozyten im Prostatabindegewebe und in den Muskelschichten des Darms gezeigt werden, wohingegen nur vereinzelt SSTR2-positive Zellen im Prostatabindegewebe zu finden waren. In den Keimzentren der Lymphknoten zeigten sich hingegen zahlreiche SSTR2-positive Zellen. hSSTR5-positiv waren auch einzelne Zellen im Bindegewebe diverser Normal- und Tumorgewebe, in den Keimzentren von Lymphknoten und sehr vereinzelt in der Leber. Diese Zellen stellen möglicherweise (aktivierte) Makrophagen beziehungsweise in der Leber Kupffer-Zellen dar. Keine spezifischen Immunfärbungen für den hSSTR5 und den SSTR2 konnten dagegen in den Normalgeweben der Lunge, Leber, Prostata, Mamma, Zervix uteri oder der Ovarien gefunden werden.

Eine Reihe der mit dem UMB4 30-5 positiv gefärbten Gewebeschnitte wurde mittels Präabsorptionskontrolle auf die Spezifität der Färbung kontrolliert. In allen Fällen führte die Peptidneutralisation zur kompletten Aufhebung der Immunfärbung. Beispielhaft sind in Abbildung 14 die Immunfärbungen mittels des neutralisierten Antikörpers UMB4 30-5 an Langerhans-Inseln und an Lymphknotenmetastasen neuroendokriner Tumore dargestellt.



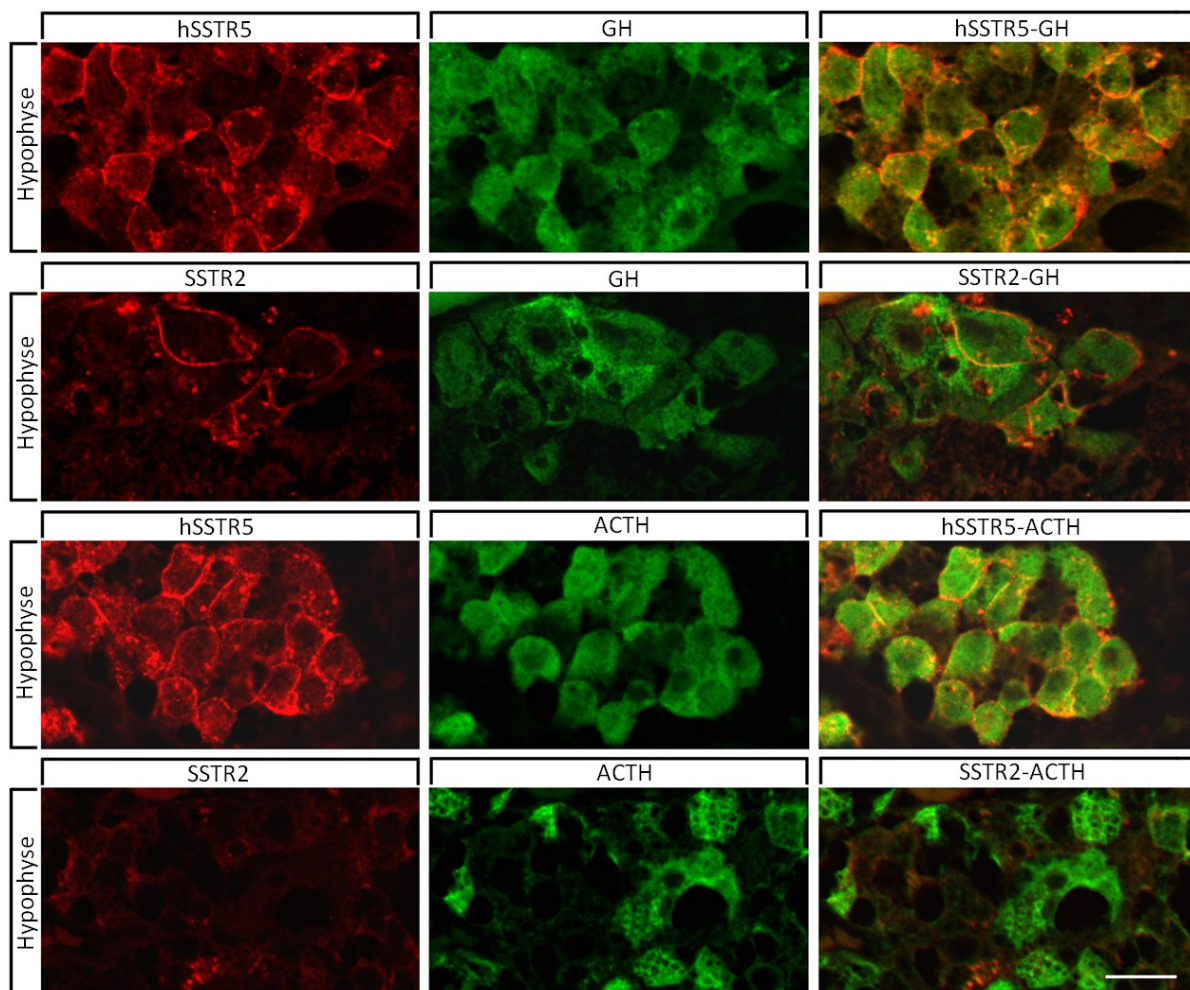
**Abb. 14:** Immunhistochemische Färbungen an humanem Gewebe mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (rotbraune Farbe), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Abgebildet sind Immunfärbungen von Langerhans-Inseln des Pankreas und von Lymphknotenmetastasen neuroendokriner Tumore (Karzinoid) (obere Zeile), sowie Färbungen derselben Gewebe nach Peptidneutralisation des UMB4 30-5 (untere Zeile). Für die Präabsorptionskontrolle wurde der Antikörper UMB4 30-5 für 2 Stunden mit seinem antigenen Peptid (10 µg/ml) vorinkubiert. Hier zeigte sich keine Immunfärbung. Bei der Immunhistochemie fand sich eine kräftige, vorwiegend membranständige Immunfärbung bei den hSSTR5-positiven Zellen. Maßstabsbalken: 100 µm.

### 5.3.2 Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen der humanen Hypophyse

Um die immunhistochemische Färbung der Somatostatin Rezeptoren durch die Antikörper UMB4 30-5 und UMB1 97-1 in der Hypophyse präziser den einzelnen hormonproduzierenden Zellen zuordnen zu können, wurden weiterführende Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden jeweils mit einem der beiden Somatostatin-Rezeptor-Antikörper inkubiert und dazu mit einem Antikörper gegen ACTH oder GH. Somit entstanden die Doppelfärbungen hSSTR5–ACTH und hSSTR5–GH sowie SSTR2–ACTH und SSTR2–GH. Die Kaninchen-Anti-hSSTR5- und Kaninchen-Anti-SSTR2-Antikörper wurden mit Hilfe eines Cy3-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörpers detektiert. Die entsprechenden Rezeptoren stellten sich so durch eine rote Fluoreszenz dar. Die Maus-Anti-GH- und Maus-Anti-ACTH-Antikörper wurden mit Hilfe eines Alexa-488-gekoppelten Esel-Anti-Maus-Antikörpers nachgewiesen. Diese Rezeptoren wurden durch eine grüne Fluoreszenz aufgezeigt.



Der Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 und der Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 führten zu einer membranständigen roten Immunfärbung. Die Wachstumshormon-produzierenden und die ACTH-produzierenden Zellen wurden durch den Anti-GH-beziehungsweise den Anti-ACTH-Antikörper kräftig grün angefärbt. Der UMB4 30-5 führte bei allen GH- und ACTH-positiven Zellen zu einer membranständigen roten Immunfärbung (Abb. 15, 1. und 3. Zeile). Die Immunfluoreszenz durch den Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 konnte hingegen nur bei einem Teil der GH-positiven-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 15, 2. Zeile) und nicht bei den ACTH-produzierenden Zellen (Abb. 15, 4. Zeile).

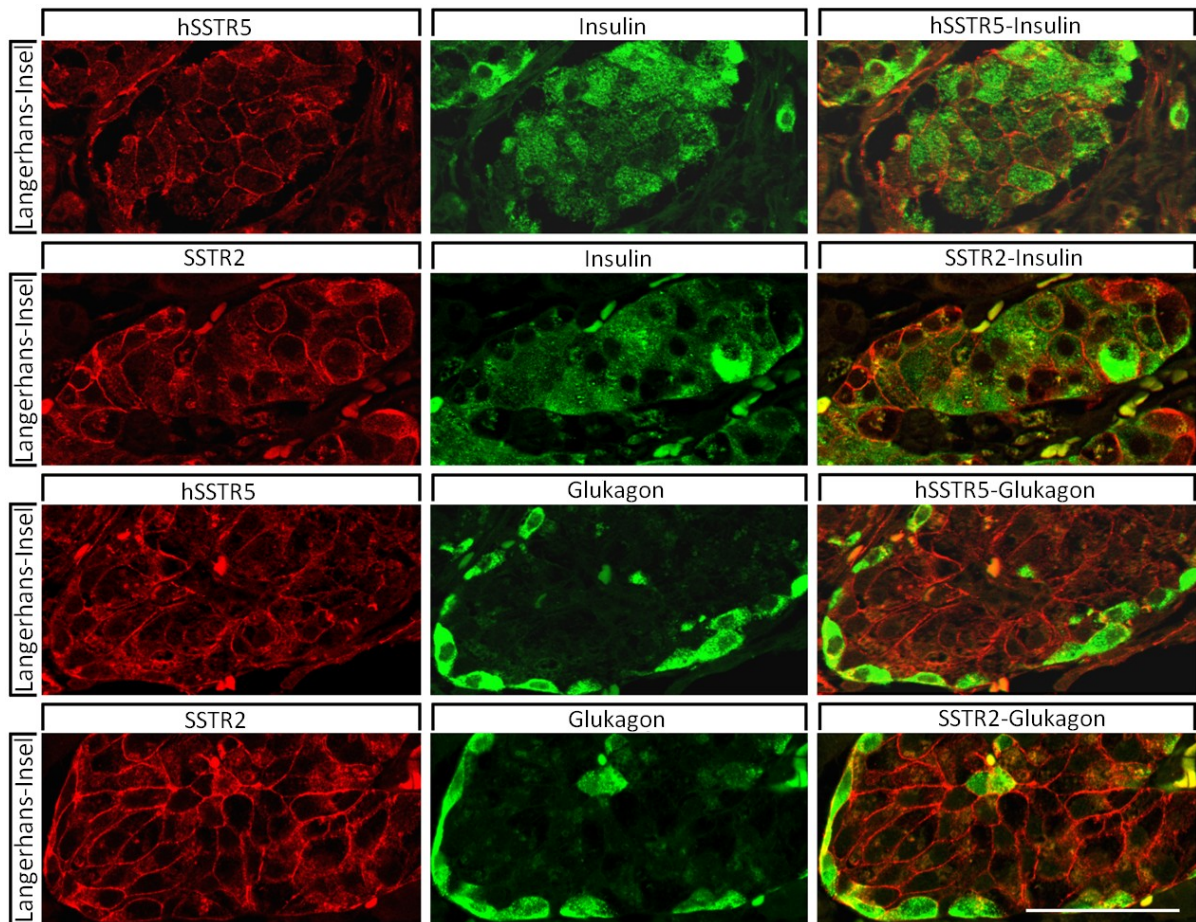


**Abb. 15:** Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen der humanen Hypophyse. Die Gewebeschnitte wurden jeweils mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (1. und 3. Zeile) oder dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (2. und 4. Zeile) inkubiert und zusätzlich mit einem monoklonalen Antikörper entweder gegen GH (1. und 2. Zeile) oder ACTH (3. und 4. Zeile). Die Kaninchen-Antikörper UMB4 30-5 und UMB1 97-1 wurden mit Hilfe eines Cy3-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörpers detektiert (rote Fluoreszenz), die Maus-Anti-GH- und -Anti-ACTH-Antikörper mit Hilfe eines Alexa-488-gekoppelten Esel-Anti-Maus-Antikörpers (grüne Fluoreszenz). Der Antikörper UMB4 30-5 führte zu einer membranständigen Immunfärbung bei allen GH- und ACTH-positiven Zellen. Der Antikörper UMB1 97-1 zeigte hingegen nur bei einem Teil der GH-positiven-Zellen eine Immunfluoreszenz, nicht jedoch bei den ACTH-produzierenden Zellen. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

### 5.3.3 Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen des humanen Pankreas

Auch am Pankreasgewebe wurden zusätzlich Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt, um die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen genauer den endokrinen Zellen zuordnen zu können. Die Gewebeschnitte wurden jeweils mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 oder dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 inkubiert und zudem mit einem Antikörper entweder gegen Insulin oder Glukagon. Somit entstanden die Doppelfärbungen hSSTR5–Insulin und hSSTR5–Glukagon sowie SSTR2–Insulin und SSTR2–Glukagon. Die Kaninchen-Antikörper UMB4 30-5 und UMB1 97-1 wurden mit Hilfe eines Cy3-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörpers detektiert. Der SSTR5 und der SSTR2 waren als rote Fluoreszenz sichtbar. Mit Hilfe eines Alexa-488-gekoppelten Esel-Anti-Maus-Antikörpers wurden die Maus-Anti-Insulin- und -Anti-Glukagon-Antikörper nachgewiesen. Somit wurden Insulin- und Glukagon-haltige Zellen durch eine grüne Fluoreszenz markiert.

Der Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 und auch der Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 führten zu einer kräftigen membranständigen roten Immunfärbung. Die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen und die Glukagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen wurden durch den Anti-Insulin-Antikörper beziehungsweise durch den Anti-Glukagon-Antikörper kräftig grün angefärbt. Die  $\beta$ -Zellen machten etwa 70 – 80 % der Zellen in der Langerhans-Insel aus und waren gleichmäßig über die Insel verteilt. Die  $\alpha$ -Zellen hingegen waren vor allem in der Inselperipherie lokalisiert und machten nur etwa 20 % der endokrinen Zellen aus. Sowohl bei so gut wie allen Insulin-positiven als auch bei fast allen Glukagon-produzierenden Zellen war gleichzeitig eine membranständige Immunfluoreszenz durch den UMB4 30-5 und durch den UMB1 97-1 darstellbar (Abb. 16).



**Abb. 16:** Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchung des humanen Pankreas. Die Gewebeschnitte wurden jeweils mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (1. und 3. Zeile) oder mit dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (2. und 4. Zeile) inkubiert und zusätzlich mit einem monoklonalen Antikörper entweder gegen Insulin (1. und 2. Zeile) oder Glukagon (3. und 4. Zeile). Die Kaninchen-Antikörper UMB4 30-5 und UMB1 97-1 wurden mit Hilfe eines Cy3-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörpers detektiert (rote Fluoreszenz), die Maus-Anti-Insulin- und -Anti-Glukagon-Antikörper mit Hilfe eines Alexa-488-gekoppelten Esel-Anti-Maus-Antikörpers (grüne Fluoreszenz). UMB4 30-5 und UMB1 97-1 führten zu einer membranständigen Immunfärbung bei allen Insulin-positiven und Glukagon-positiven Zellen. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

### 5.3.4 Immunhistochemische Untersuchungen an humanem Tumorgewebe

Weitere immunhistochemische Färbungen wurden mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 und dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 an humanen neoplastischen Gewebeschnitten durchgeführt. Die Auswertung der Färbung erfolgte nach dem Immunreaktiven Score (IRS); sie ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Auswertung der immunhistochemischen Färbung an humanem Tumorgewebe mit Hilfe des Immunreaktiven Scores (IRS) (MW = mittlerer IRS-Wert, min. = minimaler IRS-Wert, max. = maximaler IRS-Wert, SSTR = Somatostatin-Rezeptor, MTS = Metastase).

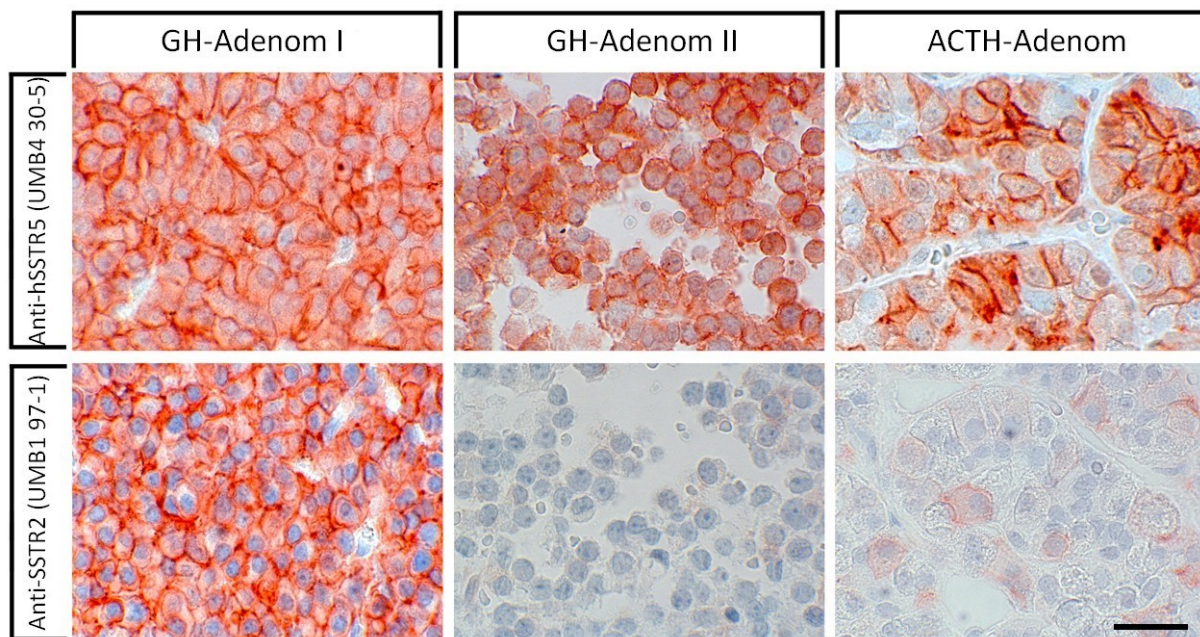
Tumortyp (n = Gesamtanzahl)	hSSTR5 positive	IRS hSSTR5			SSTR2 positive	IRS SSTR2		
	Fälle	MW	min.	max.	Fälle	MW	min.	max.
GH-Hypophysenadenom (25)	25	9,2	4	12	21	8,3	1	12
ACTH-Hypophysenadenom (5)	4	7,5	4	10	0	-	-	-
Pankreaskarzinom (5)	0	-	-	-	0	-	-	-
Nierenzellkarzinom (11)	0	-	-	-	0	-	-	-
Phäochromozytom (11)	9	6,1	1	12	8	6,3	1,5	12
Neuroendokriner Tumor (75)	57	5,7	1	12	48	7,7	0,2	12
Lunge (4)	3	6,5	4	8	2	7,5	7	8
Darm (33)	24	5,6	1	12	24	7,0	0,2	12
Insulinom (14)	11	6,0	2	12	9	9,8	4	12
Lymphknoten-MTS (12)	9	5,6	2	10	5	6,0	2	12
Leber-MTS (12)	10	5,3	1	8	8	8,8	4,5	12
Prostatakarzinom (9)	7	3,6	1	8	1	2,5	-	-
Mammakarzinom (10)	9	4,6	2	8	2	8,0	4	12
Zervixkarzinom (8)	5	3,5	2	4,5	0	-	-	-
Ovarialkarzinom (11)	8	5,8	3	12	0	-	-	-

In nahezu allen Fällen, in denen es zu einer Immunfärbung durch den Antikörper UMB4 30-5 oder UMB1 97-1 kam, war die Färbung membranständig (Abb. 17, 18, 19, 20). Allerdings war bei allen hSSTR5- und SSTR2-positiven Tumor-Entitäten eine große interindividuelle Variabilität auffällig, sowohl in Bezug auf die Intensität der Färbung als auch auf den



prozentualen Anteil an gefärbten Zellen im Gewebe. Diese spiegelt sich in den Differenzen zwischen den Minimal- und Maximalwerten des IRS wieder (Tabelle 6).

Der Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 führte zu einer deutlichen, membranständigen Immunfärbung bei allen GH-produzierenden und bei dem Großteil der ACTH-produzierenden **Hypophysenadenomen**. Im Gegensatz dazu konnte eine Immunfärbung durch den Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 nur bei 85 % der GH-positiven Tumore, nicht jedoch bei den ACTH-produzierenden Hypophysenadenomen nachgewiesen werden (Tabelle 6, Abb. 17).

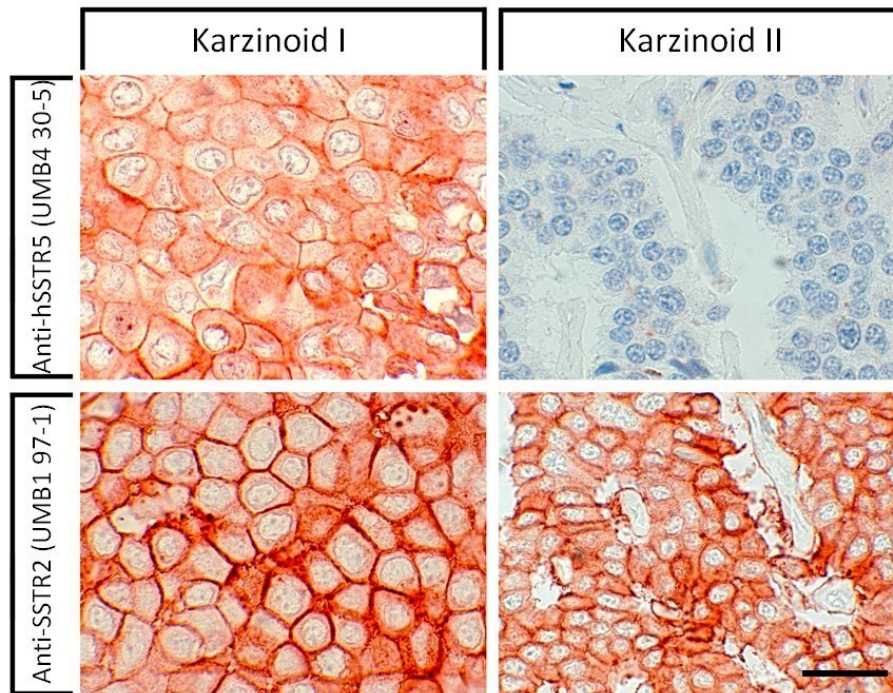


**Abb. 17:** Immunhistochemische Färbungen an humanem Hypophysenadenomen mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (1. Zeile) und dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (2. Zeile) (rotbraune Farbe), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Abgebildet sind Immunfärbungen von zwei verschiedenen GH-produzierenden Hypophysenadenomen (GH-Adenom I und II) und einem ACTH-freisetzenden Hypophysenadenom (ACTH-Adenom). Bei der Immunhistochemie zeigte sich eine kräftige, vorwiegend membranständige Immunfärbung sowohl bei den hSSTR5- als auch bei den SSTR2-positiven Zellen. Zu beachten ist, dass einige GH-produzierenden Hypophysenadenome sowohl hSSTR5- als auch SSTR2-positiv waren und andere hingegen nur den hSSTR5 aufwiesen. Die ACTH-produzierenden Hypophysenadenome zeigten alle nur den hSSTR5. Maßstabsbalken: 100 µm.

Bei den **Pankreas-** und **Nierenzellkarzinomen** zeigte sich weder mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 noch mit dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 eine positive Immunfärbung (Tabelle 6). Hingegen kam es in 76 % der getesteten **neuroendokrinen Tumore** durch den UMB4 30-5 zu einer Anfärbung. Hierbei spielte die Herkunft des Präparates aus Lunge, Darm, Pankreas oder Metastasen keinen großen Einfluss. Bei den Untersuchungen mit Hilfe des UMB1 97-1 konnte dagegen nur bei 64 % der Proben eine

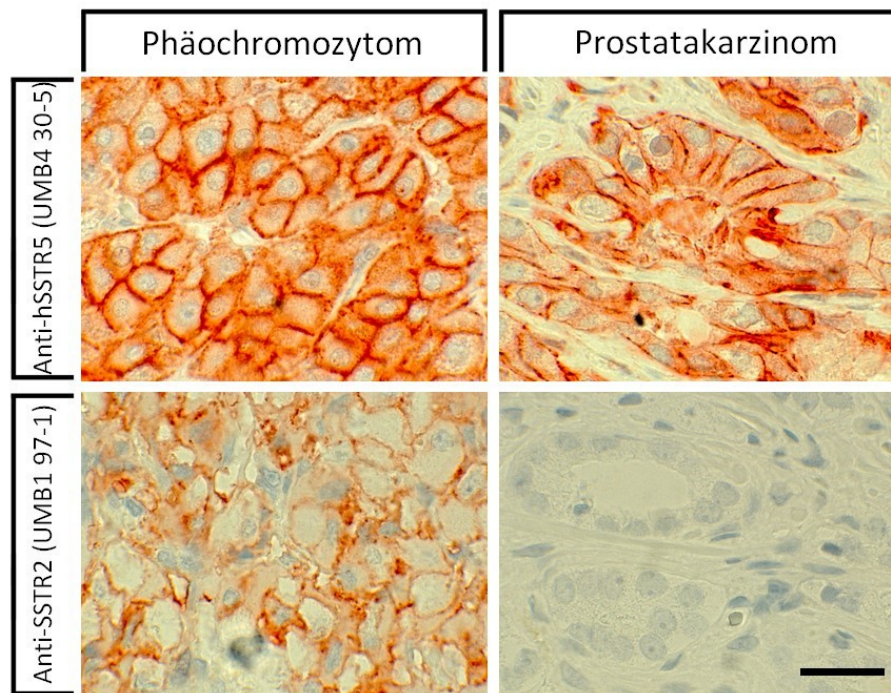


positive Immunfärbung beobachtet werden. Insbesondere bei den neuroendokrinen Tumoren der Lunge und bei den Lymphknotenmetastasen fiel eine geringe Prävalenz auf. Allerdings war der mittlere IRS bei den SSTR2-positiven NETs generell höher als der IRS der hSSTR5-positiven Tumore (Tabelle 6). Einige neuroendokrine Tumore waren sowohl hSSTR5- als auch SSTR2-positiv, wohingegen andere entweder nur den hSSTR5 oder nur den SSTR2 aufwiesen (Abb. 18).



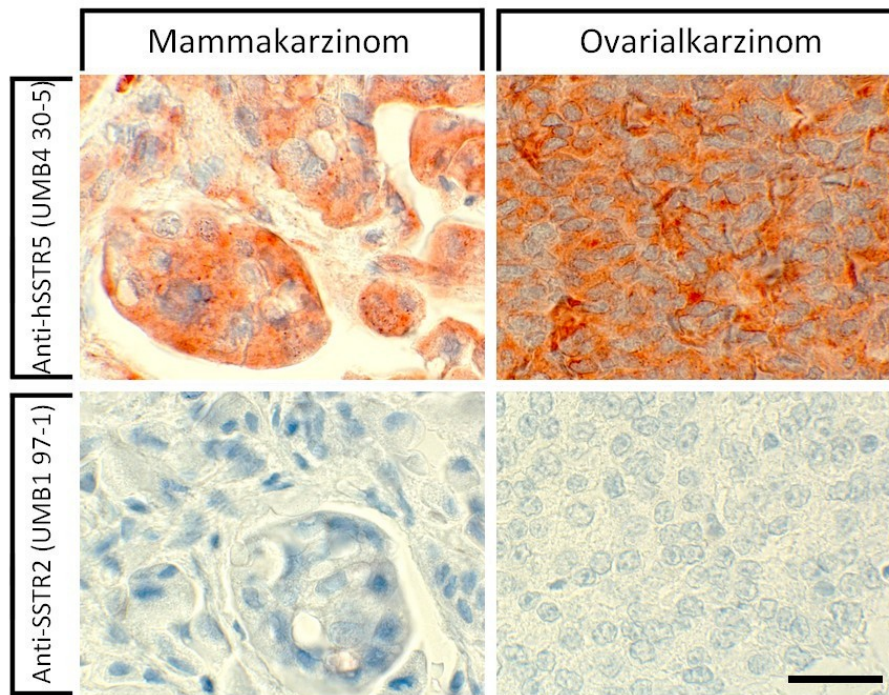
**Abb. 18:** Immunhistochemische Färbungen an humanem Tumorgewebe mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (1. Zeile) und dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (2. Zeile) (rotbraune Farbe), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Abgebildet sind Immunfärbungen von zwei verschiedenen neuroendokrinen Tumoren (Karzinoid I und II). Bei der Immunhistochemie zeigte sich eine kräftige, vorwiegend membranständige Immunfärbung sowohl bei den hSSTR5- als auch bei den SSTR2-positiven Zellen. Zu beachten ist, dass einige Tumoren sowohl hSSTR5- als auch SSTR2-positiv waren und andere hingegen nur den SSTR2 aufwiesen. Maßstabsbalken: 100 µm.

Bei den **Phäochromozytomen** fand sich starke Immunfärbung in 82 % der Fälle bei den Färbungen mit dem UMB4 30-5 und in 73 % der Fälle bei Nutzung des UMB1 97-1. Auch hier waren einige Tumore sowohl hSSTR5- als auch SSTR2-positiv, andere hingegen besaßen entweder den hSSTR5 oder den SSTR2 (Tabelle 6, Abb. 19). Von den **Prostatakarzinomen** waren 78 % hSSTR5-positiv. Im Gegensatz dazu zeigte jedoch nur eines der Karzinome eine schwache Immunfärbung mit dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (Tabelle 6, Abb. 19).



**Abb. 19:** Immunhistochemische Färbungen an humanem Tumorgewebe mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (1. Zeile) und dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (2. Zeile) (rotbraune Farbe), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Abgebildet sind Immunfärbungen von einem Phäochromozytom und einem Prostatakarzinom. Bei der Immunhistochemie zeigte sich ein kräftiges, vorwiegend membranständiges Signal sowohl bei den hSSTR5- als auch bei den SSTR2-positiven Zellen. Zu beachten ist, dass die untersuchten Phäochromozytome sowohl den hSSTR5 als auch den SSTR2 trugen, Prostatakarzinome hingegen nur den hSSTR5 aufwiesen. Maßstabsbalken: 100 µm.

Ähnlich fiel die Auswertung der Färbungen der **Mammakarzinome** aus. 90 % dieser Karzinome zeigten eine Anfärbung durch den Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5. Den SSTR2 wiesen hingegen nur 20 % der Tumore auf, diese waren jedoch stark markiert (Tabelle 6, Abb. 20). In mehr als der Hälfte der **Zervix-** und **Ovarialkarzinome** kam es durch den Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 zu einer positiven Immunfärbung. Eine SSTR2-Expression konnte dagegen in keinem der getesteten Fälle nachgewiesen werden (Tabelle 6, Abb. 20).



**Abb. 20:** Immunhistochemische Färbungen an humanem Tumorgewebe mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 (1. Zeile) und dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 (2. Zeile) (rotbraune Farbe), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Abgebildet sind Immunfärbungen von einem Mammakarzinom und einem Ovarialkarzinom. Bei der Immunhistochemie zeigte sich eine kräftige, vorwiegend membranständige Immunfärbung sowohl bei den hSSTR5- als auch bei den SSTR2-positiven Zellen. Zu beachten ist, dass die abgebildeten Tumorarten vorwiegend den hSSTR5 aufwiesen. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

## 6 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, den neuen monoklonalen Kaninchen-Antikörper UMB4 30-5 zu charakterisieren, um mit dessen Hilfe die Expression des Somatostatin-Rezeptors 5 in normalen und neoplastischen humanen Geweben zu untersuchen. Zur Analyse der Sensitivität und Spezifität des Antikörpers und zur Bestimmung des Expressionsmusters des hSSTR5 in verschiedenen Geweben wurden immunzytochemische Untersuchungen an stabil transfizierten Zellen, Western-Blot-Analysen und immunhistochemische Färbungen mit dem UMB4 30-5 durchgeführt.

In den Versuchen wurde parallel zum UMB4 30-5 der monoklonale Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 eingesetzt, um einen Vergleich zum Expressionsmuster des Somatostatin-Rezeptors 2 herstellen zu können. Dieser Anti-SSTR2-Antikörper ist bereits in früheren Untersuchungen ausführlich charakterisiert worden (Fischer et al. 2008).

### 6.1 Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen

Zur Darstellung des humanen Somatostatin-Rezeptors 5 auf zellulärer Ebene wurden stabil transfizierte HEK-hSSTR5-Zellen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB4 30-5 immunzytochemisch gefärbt. Diese HEK-293-Zellen exprimieren den hSSTR5, die Zielstruktur des zu charakterisierenden Antikörpers, im Bereich der Zellmembran. Sie sind somit gut geeignet, um zu testen, ob der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 sein Antigen spezifisch erkennt. Zusätzlich wurden HEK-SSTR2-Zellen immunzytochemisch gefärbt, die stabil den SSTR2 auf ihrer Zellmembran exprimieren. Um die Expression des SSTR2 in diesen Zellen zu zeigen, erfolgten Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper UMB1 97-1. Da die HEK-SSTR2-Zellen nur den SSTR2 besitzen, nicht jedoch den hSSTR5, sind sie gut geeignet, um den monoklonalen Antikörper UMB4 30-5 auf eine Kreuzreaktivität zu testen, sowohl gegenüber dem SSTR2 als auch gegen Antigene in den HEK-Zellen im Allgemeinen. Hierfür wurden immunzytochemische Färbungen der HEK-SSTR2-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper UMB4 30-5 durchgeführt.

Bei der Färbung der HEK-hSSTR5-Zellen mit dem Antikörper UMB4 30-5 zeigte sich eine starke membranständige Immunfluoreszenz und eine geringere intrazelluläre perinukleäre Färbung. Diese zeigt die Lokalisation des hSSTR5 in stabil transfizierten HEK-293-Zellen, wie sie bereits in vorangegangenen Untersuchungen gefunden wurde (Stroh et al. 2000, Cescato et al. 2006). Der UMB1 97-1 führte bei den HEK-hSSTR5-Zellen nicht zu einer



Immunfärbung, da sein Antigen, der SSTR2, in diesen Zellen nicht exprimiert wird. Die immunzytochemischen Färbungen der HEK-SSTR2-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper UMB1 97-1 zeigten hingegen eine starke membranständige Immunfluoreszenz. Dieses Ergebnis war erwartet worden, da es schon von verschiedenen Autoren beschrieben worden war (Cescato et al. 2006, Fischer et al. 2008). Die Färbungen dieser HEK-SSTR2-Zellen mit dem UMB4 30-5 führten zu keiner Immunfluoreszenz, was eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem SSTR2 ausschließen lässt.

## 6.2 Western-Blot-Analysen

Zur Kontrolle der Spezifität des neuentwickelten monoklonalen Antikörpers UMB4 30-5 wurden Western-Blot-Analysen sowohl an stabil transfizierten HEK-hSSTR5- und HEK-SSTR2-Zellen als auch an Gewebeproben von vier verschiedenen humanen neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts (T1-T4) durchgeführt.

Der Antikörper UMB4 30-5 detektierte bei den HEK-hSSTR5-Zellen eine breite Bande zwischen 55 und 70 kDa. Diese Bande entspricht dem Molekulargewicht des glykosylierten humanen Somatostatin-Rezeptors 5, welches in der Literatur mit 52 bis 66 kDa beschrieben wird (Helboe et al. 1997, Patel 1999, Helboe und Möller 2000). In den HEK-SSTR2-Zellen wies der Antikörper UMB1 97-1 den Somatostatin-Rezeptor 2 mit einer Größe von 70 bis 80 kDa nach, welche ebenfalls dem erwarteten Molekulargewicht entspricht (Sternini et al. 1997, Schulz et al. 1998a, Fischer et al. 2008). Der Antikörper UMB4 30-5 detektierte in diesen Zellen keine Bande. Er zeigte somit keine unspezifische Reaktion sowohl gegenüber dem SSTR2 als auch gegenüber weiteren vorhandenen Proteinen.

Um zu testen, ob der UMB4 30-5 den hSSTR5 auch in Gewebekomponenten detektieren kann und ob er eine Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen in humanen Geweben zeigt, wurden Western-Blot-Analysen an humanen neuroendokrinen Tumorgewebeproben durchgeführt. Die Expression von Somatostatin-Rezeptoren in neuroendokrinen Tumoren wurde schon in verschiedenen Studien belegt (Lamberts et al. 1996, de Herder und Lamberts 2002, Hofland und Lamberts 2003). Durch die hohe Expressionsrate des SSTR2 mit 80 % und des SSTR5 mit 77 % (Hofland und Lamberts 2003) eignet sich dieser Tumortyp gut zum Nachweis der Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5 im Gewebe. Der Antikörper UMB4 30-5 detektierte auch im neuroendokrinen Tumorgewebe nur sein Rezeptorantigen bei einer Größe von 55 bis 70 kDa, er wies keine weiteren Banden nach. Der hSSTR5 konnte so in zwei der vier getesteten Tumoren aufgezeigt werden. Da der UMB4 30-5 nur eine Bande beim spezifischen

Gewicht des hSSTR5 detektierte, kann davon ausgegangen werden, dass der Antikörper sein Antigen auch in humanen Geweben stabil nachweist.

Um die Spezifität des UMB4 30-5 weiter zu bestimmen, wurden Präabsorptionskontrollen durchgeführt. Diese sind durch vorausgegangene Studien zur Spezifitätstestung bei Western-Blot-Analysen etabliert (Frei et al. 2001, Schulz et al. 2004, Schulz et al. 2006, Burry 2011). Der Antikörper UMB4 30-5 wurde hierfür mit dem hSSTR5-Peptid inkubiert, welches zur Generierung des Antikörpers verwendet worden war. Er bindet das Peptid, sein spezifisches Antigen, und kann somit nicht mehr mit den entsprechenden Gewebeantigenen reagieren (Burry 2011). Eine spezifische Immundetektion entfällt somit nach erfolgreicher Präabsorption. In den Western-Blot-Analysen, die nach der Präabsorption des UMB4 30-5 mit seinem hSSTR5-Antigen an neuroendokrinen Tumorgeweben durchgeführt wurden, kam es zu keinem spezifischen Signal. Die ohne Präabsorption in den Gewebeproben vom Antikörper detektierten Banden im Bereich von 55 bis 70 kDa wurden durch die Peptid-Inkubation aufgehoben. In der Literatur sind analoge Ergebnisse zu finden. So beschrieben Helboe und Møller, dass es nach Präabsorption von polyklonalem Anti-SSTR5-Antiserum bei der Western-Blot-Analyse von BHK-Zellen (baby hamster kidney cells), die den SSTR5 exprimieren, zur Aufhebung der vorher detektierten spezifischen Bande kam (Helboe und Møller 2000).

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbungen und der Western-Blot-Analysen sprechen dafür, dass der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 sein Antigen, den humanen Somatostatin-Rezeptor 5, mit hoher Spezifität detektiert und keine Kreuzreaktivität zeigt. Er wurde daraufhin für immunhistochemische Färbungen an humanem Gewebe eingesetzt, um die Expression des hSSTR5 in Normal- und Tumorgewebe zu untersuchen. Um zum Vergleich das Expressionmuster des SSTR2 darzustellen, wurden die Gewebeschnitte parallel mit dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 gefärbt.

### **6.3 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Normalgeweben**

Der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 ist der erste Antikörper, der eine gute Detektion des Membranrezeptors SSTR5 in in Formalin fixierten und in Paraffinblöcken eingebetteten humanen Geweben ermöglicht (Lupp et al. 2011). Durch die Verwendung des UMB4 30-5 konnten neue Einblicke in die Expression und die Funktion des SSTR5 gewonnen werden, denn noch immer sind die Daten zur Verteilung der SSTRs in menschlichem Normalgewebe unvollständig, was hauptsächlich an der limitierten Verfügbarkeit an normalen menschlichen

Gewebeproben liegt (Reubi 2003). Die vielen Daten, die mit Hilfe von verschiedenen Tierspezies gewonnen werden, können aufgrund der bekannten Speziesunterschiede nicht direkt auf den Menschen übertragen werden (Reubi 2003).

Die SSTR-Subtypen kommen im ganzen Körper weitverbreitet vor (Taniyama et al. 2005), so zum Beispiel im zentralen und peripheren Nervensystem (Csaba und Dournaud 2001), im Gastrointestinaltrakt (Reubi et al. 1999, Casini Raggi et al. 2002), im Pankreas (Reubi et al. 1998, Kumar et al. 1999, Portela-Gomes et al. 2000), in der Niere (Balster et al. 2001, Bhandari et al. 2008) und in anderen Organen. Da die SSTR-Subtypen auch in lymphatischen Zellen (Tsutsumi et al. 1997, Ghamrawy et al. 1999, Talme et al. 2001), Makrophagen (Dalm et al. 2003a, Dalm et al. 2003b), Fibroblasten (Gaudillère et al. 1999, Buchan et al. 2002) und in Zellen der Blutgefäße (Curtis et al. 2000, Badway et al. 2004) gefunden wurden, die in allen Geweben vorkommen, ist eine in-situ-Untersuchung der Expression der SSTR-Subtypen nötig. Diese Erkenntnis macht es auch nahezu unmöglich, präzise Daten zur Verteilung der SSTR-Subtypen mit Methoden wie RT-PCR und Western-Blot, die das gesamte Gewebe als eine Masse behandeln, zu erreichen (Taniyama et al. 2005). Deswegen wurden in dieser Arbeit immunhistochemische Methoden verwendet, um die Verteilung des SSTR2 und des SSTR5 mit Hilfe der monoklonalen Antikörper UMB1 97-1 und UMB4 30-5 im humanen Gewebe zu untersuchen.

Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper ließ sich eine membranständige Expression des SSTR2 und des SSTR5 in vielen Zellen der **Adenohypophyse** nachweisen. Dass die Zellen des Hypophysenvorderlappens verschiedene Somatostatin-Rezeptoren exprimieren, wurde schon 1995 mittels PCR gezeigt (Panetta und Patel 1995). Hierbei wurden der SSTR1, der SSTR2, der SSTR3 und der SSTR5 gefunden (Panetta und Patel 1995), wobei die Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5 am häufigsten in den Hypophysenzellen vorkamen (Ben-Shlomo und Melmed 2010). Da bekannt ist, dass Somatostatin und seine Analoga Einfluss auf die GH- und ACTH-Sekretion haben (Brazeau et al. 1973, van der Hoek et al. 2005, Melmed 2006, Schmid 2008, Ben-Shlomo und Melmed 2010, Petersenn et al. 2010), wurden an die immunhistochemischen Färbungen Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen angeschlossen. Diese sollten die Verteilung des SSTR2 und des SSTR5 in den ACTH- und GH-produzierenden Zellen zeigen (siehe Kapitel 6.3.1).

In der **Darmschleimhaut** wurden mit Hilfe der Antikörper UMB1 97-1 und UMB4 30-5 vereinzelte Zellen mit membranständiger SSTR2- und SSTR5-Expression gefunden. Diese Färbungen zeigten die neuroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltrakts, in denen Somatostatin produziert und sezerniert wird, sowie die neuroendokrinen Zellen, die durch das

Peptidhormon in ihrer Funktion beeinflusst werden (Hökfelt et al. 1975, Patel 1999, Taniyama et al. 2005, Pisarek et al. 2010a). Taniyama et al. konnten ebenfalls mit immunhistochemischen Färbungen nachweisen, dass sowohl der SSTR2 als auch der SSTR5 in verschiedenen Drüsen- und Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts exprimiert werden (Taniyama et al. 2005). An den verschiedenen Zielzellen des SSTs im Magen-Darm-Trakt vermittelt Somatostatin über die SSTRs seine vielfältigen Effekte. So hemmt es die Sekretion und Wirkung zahlreicher Peptidhormone, verlangsamt die Darmmotilität und beeinflusst auch regulierend die Nährstoffresorption (Reichlin 1983, Lamberts et al. 1996, Patel 1999).

Dass die Somatostatin-Rezeptor-Subtypen in den **Langerhans-Inseln des Pankreas** vorkommen, wurde schon oft beschrieben (Atiya et al. 1997, Kumar et al. 1999, Portela-Gomes et al. 2000). Die Antikörper UMB1 97-1 und UMB4 30-5 detektierten in den immunhistochemischen Färbungen, wie erwartet, viele Inselzellen mit membranständiger SSTR2- und SSTR5-Expression. Da davon ausgegangen wird, dass Somatostatin die Insulin- und Glukagon-Sekretion beeinflusst (Atiya et al. 1997, Portela-Gomes et al. 2000), wurden Doppel-Immunfluoreszenz Färbungen angeschlossen. So wurde die Verteilung des SSTR2 und des SSTR5 in den Insulin- und Glukagon-produzierenden Zellen untersucht (siehe Kapitel 6.3.1).

Auch in der **Niere** sind von anderen Autoren bereits verschiedene Somatostatin Rezeptoren nachgewiesen worden (Bhandari et al. 2008). Dies ist zu erwarten, denn in der Niere hat Somatostatin ebenfalls einen regulativen Einfluss. So reduziert es die glomeruläre Filtrationsrate und vermindert den renalen Blutfluss, indem es eine direkte renale Vasokonstriktion vermittelt (Schmidt et al. 2002). Des Weiteren hat es antidiuretische Wirkungen (Ray et al. 1993), vermindert die Aldosteron- und Renin-Sekretion (Jones et al. 1984, Mazzocchi et al. 1992, Reubi et al. 1993) und hat einen antiproliferativen Einfluss (Hatzoglou et al. 1996, Turman und Apple 1998). Der Antikörper UMB4 30-5 zeigte in der Niere eine SSTR5-Expression an der Zellmembran der Endothelzellen der glomerulären Kapillaren auf, aber nicht in den Podozyten, den Mesangiumzellen, der Bowman-Kapsel oder in den Tubuli. Bhandari et al. wiesen den SSTR5 immunhistochemisch mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern ebenfalls in den glomerulären Zellen nach, aber auch in tubulären Zellen (Bhandari et al. 2008). In den Untersuchungen mit dem Antikörper UMB1 97-1 konnte keine SSTR2-Expression in den glomerulären Kapillaren gefunden werden, jedoch wurden vereinzelt Zellen im Interstitium des Nierengewebes positiv gefärbt, die vermutlich Erythropeotin-produzierenden Fibroblasten entsprechen. Diese Vermutung sollte mit weiterführenden Doppel-Immunfärbungen noch belegt werden. Dass Fibroblasten SSTRs



exprimieren, konnte von anderen Autoren bereits gezeigt werden (Gaudillère et al. 1999). Auch Bhandari et al. fanden in den glomerulären Kapillaren keine SSTR2-Expression, wohingegen sie den Rezeptor in den Tubulus-Zellen ebenfalls nachweisen konnten (Bhandari et al. 2008).

In den **Nebennieren** detektierte der Antikörper UMB4 30-5 keine SSTR5-Expression. Der UMB1 97-1 zeigte hingegen eine starke positive Immunfärbung des Nebennierenmarks. Obwohl schon lange bekannt ist, dass die Nebenniere ein Zielorgan für Somatostatin ist und Somatostatin-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen gefunden wurden (Maurer und Reubi 1986), sind die Daten zum Vorkommen der Somatostatin-Rezeptoren in der Nebenniere rar und oft widersprüchlich (Pisarek et al. 2008). So fanden Unger et al. eine Expression des SSTR5 und des SSTR2 in immunhistochemischen Färbungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern in der Nebennierenrinde, aber nicht im Nebennierenmark (Unger et al. 2008), wohingegen Kimura et al. eine SSTR2-Expression vorwiegend im Nebennierenmark zeigten (Kimura et al. 2001).

Der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 detektierte im **Prostatagewebe** vereinzelte Zellen mit hSSTR5-Expression. Hierbei wiesen vor allem Stroma-Zellen und Myozyten den SSTR5 auf. Der SSTR2 konnte in den immunhistochemischen Färbungen nur bei vereinzelten Zellen im Stroma gefunden werden. In der Literatur sind die Angaben zur SSTR-Expression im Normalgewebe der Prostata widersprüchlich. Dizeyi et al. fanden zum Beispiel mittels PCR und Immunhistochemie nur den SSTR2 in Stroma-Zellen und den SSTR3 und 4 in den Epithelzellen der menschlichen Prostata, den SSTR5 konnten sie aber gar nicht detektieren (Dizeyi et al. 2002). Sinisi et al. konnten hingegen mittels PCR den SSTR2, den SSTR4 und den SSTR5 in den Epithelzellen, aber keinen der fünf Somatostatin-Rezeptoren SSTR1-5 im Stroma nachweisen (Sinisi et al. 1997). Diese divergierenden Ergebnisse sind vermutlich auf die verschiedenen angewendeten Methoden zurückzuführen, die alle unterschiedlich sensitiv sind in der Detektion der SSTRs.

In den **Lymphknoten** wies der UMB4 30-5 einzelne Zellen innerhalb der Keimzentren mit starker SSTR5-Expression nach. Diese Zellen entsprechen möglicherweise Makrophagen, bei denen eine SSTR-Expression bekannt ist und die von essentieller Bedeutung für die Immunantwort sind (Dalm et al. 2003a, Dalm et al. 2003b, Ferone et al. 2004). Zahlreiche Zellen mit membranständiger SSTR2-Expression detektierte der UMB1 97-1 in den Keimzentren der Lymphknoten. Reubi et al. fanden in Lymphknoten ebenfalls eine breite Verteilung der SSTR-Subtypen. In den Keimzentren detektierten sie vorwiegend den SSTR2,

wohingegen sie im lymphoretikulären Gewebe den SSTR2, 3 und 5 nachwiesen (Reubi et al. 2001).

In der **Leber** zeigte der monoklonale Anti-hSSTR5-Antikörper einzelne Zellen mit SSTR5-Expression auf. Morphologisch entsprechen diese am ehesten Makrophagen beziehungsweise den leberspezifischen Kupffer-Zellen. Zur SSTR-Expression im Lebergewebe gibt es nur wenige Daten. Mittels Immunhistochemie und unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern untersuchten Reynaert et al. die Expression der SSTR1 bis 5 in der Leber. Sie konnten vor allem im Gallengangsepithel die SSTR1, 2, 3 und 4 nachweisen, der SSTR5 wurde in nur wenigen der untersuchten Gewebe detektiert. In den Hepatozyten und in den Endothelzellen der Lebersinusoiden konnten sie keine SSTR-Expression finden, die Kupffer-Zellen wurden nicht im Speziellen beschrieben (Reynaert et al. 2004). Der UMB4 30-5 wies außer vereinzelt in den Kupffer-Zellen keine weitere SSTR5-Expression in den untersuchten Lebergeweben nach, auch nicht in den Hepatozyten oder in den Gallengangsepithelzellen. Auch eine SSTR2-Expression konnte mit Hilfe des UMB1 97-1 nicht beobachtet werden.

Im **Lungengewebe** detektierten weder der Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 noch der Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 eine Expression des SSTR5 oder des SSTR2. Dieses Ergebnis war erwartet worden, denn auch Boy et al. hatten mittels PCR- und PET/CT-Untersuchungen (Positronen-Emissions-Tomographie und Computertomografie) gezeigt, dass die SSTR-Expression nur vergleichsweise gering und dass der SSTR1 der vorherrschende Rezeptor-Subtyp im Lungengewebe ist (Boy et al. 2011).

Zur SSTR-Expression in nicht-neoplastischem **Brustgewebe** gibt es nur wenige und zum Teil widersprüchliche Daten; die meisten Analysen beschränkten sich auf Brustkrebs-Gewebe. In den Untersuchungen mit Hilfe des UMB4 30-5 und des UMB1 97-1 zeigte sich keine nennenswerte Färbung. Evans et al. beschrieben neben der Verteilung der SSTRs im Brustkrebs-Gewebe auch das Vorkommen der Rezeptoren im normalen Brustgewebe. Sie fanden den SSTR5 in 5 % der untersuchten Normalgewebeproben (Evans et al. 1997). Im Gegensatz dazu konnten Hatzoglou et al. ausschließlich den SSTR2 und den SSTR3 in der Mamma detektieren (Hatzoglou et al. 2000), was die Ergebnisse der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit teilweise bestätigt.

In den **Ovarien** und in der **Zervix uteri** ließ sich ebenfalls keine SSTR5- oder SSTR2-Expression nachweisen. Dieses Ergebnis war durch die Resultate vorhergehender Analysen zu erwarten gewesen. Denn obwohl eine SSTR-Expression in Ovarial- und Zervixkarzinomen bekannt ist, konnten die SSTRs nicht im Normalgewebe der Ovarien nachgewiesen werden (Reubi et al. 1991, Schulz et al. 2002b). In den immunhistochemischen Färbungen, die Schulz

et al. mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern am Normalgewebe der Zervix durchgeführt hatten, konnte ebenfalls keine SSTR-Expression detektiert werden (Schulz et al. 2003).

Die **Spezifität des Antikörpers** UMB4 30-5 bei den immunhistochemischen Färbungen wurde ebenfalls mittels **Präabsorptionskontrollen** überprüft. Da der Antikörper spezifisch den SSTR5 des Menschen detektiert und nicht mit den entsprechenden Rezeptoren der Ratte oder der Maus kreuzreagiert, war es nicht möglich, Knock-Out-Tiere zur Testung der Spezifität einzusetzen. Um trotzdem zu überprüfen, ob der Antikörper das gewünschte Antigen bindet und die Färbung nicht auf ein Artefakt oder eine Kreuzreaktivität zurückzuführen ist, wurde eine Präabsorptionskontrolle durchgeführt. In vorausgegangenen Untersuchungen wurde diese Art der Kontrolle auch bei immunhistochemischen Färbungen zum Ausschluss von falsch-positiven Färbungen etabliert (Saper und Sawchenko 2003, Schulz et al. 2004, Burry 2011, Schmid et al. 2012). Der Antikörper UMB4 30-5 wurde hierfür mit dem hSSTR5-Peptid inkubiert, welches zur Generierung des Antikörpers verwendet worden war. Einige der Gewebeschnitte, die mit dem UMB4 30-5 in der Immunhistochemie positiv angefärbt worden waren, wurden mittels Präabsorptionskontrolle auf die Spezifität der Färbung hin kontrolliert. In allen Fällen führte die Peptidneutralisation zur kompletten Aufhebung der Immunfärbung.

### 6.3.1 Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Der immunhistochemische Nachweis der Somatostatin-Rezeptoren 5 und 2 in der **Hypophyse** wurde mit Hilfe von Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen genauer charakterisiert und mit der Verteilung der GH- und ACTH-produzierenden Zellen verglichen. Die Gewebeschnitte wurden dafür jeweils mit den Antikörpern UMB4 30-5 oder UMB1 97-1 inkubiert und zusätzlich mit einem zweiten Antikörper gegen ACTH oder GH. Schon Panetta und Patel hatten 1995 mittels PCR nachgewiesen, dass adulte humane Hypophysen die Somatostatin-Rezeptoren 1, 2, 3 und 5 exprimieren (Panetta und Patel 1995), wobei der SSTR2 und der SSTR5 am häufigsten in den Hypophysenzellen vorkommen (Ben-Shlomo und Melmed 2010). Die Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen in dieser Arbeit zeigten, dass nahezu alle Wachstumshormon-produzierenden Zellen eine hSSTR5-Expression aufweisen, wohingegen der SSTR2 nur bei einem Teil der Zellen nachweisbar war. Vergleichbare Untersuchungen an nicht-neoplastischem Hypophysengewebe wurden vor allem an Ratten durchgeführt und zeigten ähnliche Ergebnisse. So wiesen Kumar et al. mit Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen nach, dass der SSTR5 bei ca. 90 % und der SSTR2 bei ca. 50 % aller

GH-positiven Zellen exprimiert wird (Kumar et al. 1997). Beschreibungen der SSTR-Präsenz in den einzelnen Hormon-produzierenden Zelltypen der humanen Hypophyse wurden vor allem an Hypophysen-Adenomen vorgenommen. In der Übersichtsarbeit von Ben-Shlomo und Melmed wurde 2010 die aktuelle Studienlage ausgewertet. Sie konnten zeigen, dass in GH-produzierenden Zellen sowohl der SSTR5 als auch der SSTR2 zu ca. 88 % vorkommen. Die Somatostatin-Rezeptoren 5 und 2 haben offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Regulation der GH-Sekretion (Ben-Shlomo und Melmed 2010). In ACTH-produzierenden Zellen werden verschiedene Somatostatin-Rezeptoren exprimiert, wobei der SSTR5 dominierend vorkommt (van der Hoek et al. 2005, Batista et al. 2006). Die Untersuchungen mit dem UMB4 30-5 konnten den hSSTR5 in nahezu allen ACTH-positiven Zellen nachweisen, wohingegen der SSTR2 in diesen Zellen nicht exprimiert wurde. Ben-Shlomo und Melmed beschrieben 2010 die SSTR2- und SSTR5-Expression in ACTH-produzierenden humanen Hypophysenadenomen mit einer Häufigkeit von je ca. 75 %. In den 56 Studien, die sie hierfür auswerteten, wurden zur Ermittlung der SSTR-Verteilung jedoch keine immunhistochemischen Färbungen durchgeführt (Ben-Shlomo und Melmed 2010). Dies könnte die Differenz zu den von uns gezeigten Ergebnissen erklären. Studien an murinen corticotropen Tumorzelllinien zeigten, dass die ACTH-Sekretion durch den SSTR2 und den SSTR5 reguliert wird (Strowski et al. 2002).

Um auch die Immunfärbung in den **Langerhans-Zellen des Pankreas** differenzierter beurteilen zu können, wurden hier ebenfalls weiterführende Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Dafür wurden die Gewebeschnitte des humanen Pankreas jeweils mit dem Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 oder dem Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 inkubiert und zusätzlich mit einem zweiten Antikörper zur Detektion von Insulin beziehungsweise Glukagon. Die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen zeigten fast alle eine membranständige Expression sowohl des hSSTR5 als auch des SSTR2. Portela-Gomes et al., die ebenfalls Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen von Insulin und Somatostatin-Rezeptoren durchgeführt hatten, konnten in humanen  $\beta$ -Zellen eine ähnlich hohe Expression des SSTR2 (ca. 85 %) und des SSTR5 (ca. 96 %) zeigen (Portela-Gomes et al. 2000). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Hemmung der Insulin-Sekretion sowohl durch den SSTR5 als auch durch den SSTR2 vermittelt wird (Atiya et al. 1997, Portela-Gomes et al. 2000). Die Glukagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen zeigten in den Untersuchungen dieser Arbeit fast alle eine membranständige hSSTR5- und SSTR2-Expression. In vorausgegangenen Studien konnte bereits belegt werden, dass der SSTR2 der vorherrschende Somatostatin-Rezeptor-Subtyp in  $\alpha$ -Zellen ist (Kumar et al. 1999, Portela-Gomes et al. 2000). Die

Expression des SSTR5 in humanen Glukagon-produzierenden Zellen wurde durch Kumar et al. mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern als mäßig beschrieben (Kumar et al. 1999). In den Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper UMB4 30-5 zur Detektion des hSSTR5 wurde eine stärkere SSTR5-Expression in  $\alpha$ -Zellen gefunden. Der Unterschied ist möglicherweise durch die höhere Spezifität des UMB4 30-5 im Vergleich zu dem von Kumar et al. genutzten polyklonalen Antikörper zu erklären, kann aber auch durch die ausschließlich qualitative und nicht quantitative Auswertung bedingt sein. In weiteren Untersuchungen mit dem UMB4 30-5 sollte diese Divergenz noch einmal genauer und auch quantitativ untersucht werden.

#### **6.4 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumorgeweben**

Viele Tumoren exprimieren Somatostatin-Rezeptoren (Reubi 2003), wobei diese ein molekulares Ziel von zunehmender Bedeutung in der Tumordiagnostik und -therapie darstellen (Reubi 2003, Körner et al. 2012). Somatostatin übt vielfältige Effekte auf die Tumorbilogie aus, sowohl über direkte als auch über indirekte Mechanismen. So kann durch die Interaktion von SST oder einem Somatostatin-Analagon mit den SSTRs auf den Tumorzellen direkt die Proliferation gehemmt und/oder die Apoptose der Zellen induziert werden. Auf der anderen Seite kann SST auch indirekt auf das neoplastische Gewebe wirken, indem es die IGF-1-Konzentration im Serum senkt oder indem es eine Vasokonstriktion der Gefäße rund um den Tumor fördert und somit in die Nährstoffversorgung eingreift (Pyronnet et al. 2008, Watt et al. 2008). Das Ansprechen der verschiedenen Tumorarten auf Somatostatin-Analoga hängt jedoch stark von der Präsenz bestimmter SSTR-Subtypen ab (Schulz et al. 1998b). So wird die Effektivität von Octreotid durch das Vorhandensein des SSTR2 im Tumorgewebe bestimmt (Fougner et al. 2008, Casarini et al. 2009). Im Vergleich zu Octreotid interagiert Pasireotid mit dem SSTR5 und dem SSTR1 wesentlich stärker, mit dem SSTR2 hingegen etwas schwächer (Schmid 2008). Es kann somit nicht nur als Alternative zu Octreotid eingesetzt werden, sondern auch bei Patienten, die nicht auf Octreotid ansprechen oder bei denen dessen Wirkung nachgelassen hat. Außerdem eignet sich Pasireotid zur Therapie von Erkrankungen, die aufgrund der SSTR-Expression nicht durch Octreotid beeinflusst werden können, wie zum Beispiel beim Morbus Cushing (Schmid 2008). Um beurteilen zu können, ob ein Patient ein Kandidat für eine Octreotid- oder eine Pasireotid-Therapie ist, ist es von außerordentlicher Wichtigkeit, das SSTR-Expressionsprofil der Tumorzellen zu bestimmen (Lupp et al. 2011). Die Gegenwart der SSTRs in einem Tumor

kann entweder mittels in-vivo-Szintigraphie, ex-vivo-SSTR-Autoradiographie oder durch immunhistochemische Methoden charakterisiert werden (Reubi et al. 2001, Taniyama et al. 2005, Prasad et al. 2007, Schmid et al. 2012). Im Vergleich zu den anderen Methoden hat die SSTR-Immunhistochemie deutliche Vorteile. Sie erfordert nicht die Verwendung von radioaktivem Material, ist nicht sehr zeitaufwendig und kann an Formalin-fixierten Gewebeproben während der routinemäßigen histopathologischen Untersuchung durchgeführt werden (Lupp et al. 2011). Die SSTR-Immunhistochemie ist jedoch stark von der Verfügbarkeit hoch-spezifischer Antikörper abhängig. Im Gegensatz zu den derzeit verfügbaren polyklonalen Antikörper-Seren können monoklonale Antikörper wie der UMB4 30-5 oder der UMB1 97-1 in unbegrenzter Menge und in immer gleichbleibend hoher Qualität produziert werden (Lupp et al. 2011, Schmid et al. 2012). Somit kann in Zukunft der monoklonale Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5, wie auch der Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1, während der routinemäßigen histopathologischen Untersuchung genutzt werden, um den SSTR5 beziehungsweise den SSTR2 spezifisch zu detektieren (Fischer et al. 2008, Lupp et al. 2011).

Das Vorkommen von Somatostatin-Rezeptoren in der Hypophyse und auch in **Hypophysenadenomen** ist bekannt (Shimon 2003). Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten GH-produzierenden Adenome exprimierten den SSTR5 und den SSTR2 zu je 85 %. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in der Literatur veröffentlicht. So konnten Ben-Shlomo und Melmed den SSTR5 und den SSTR2 in diesen Tumoren zu je 88 % nachweisen (Ben-Shlomo und Melmed 2010) und auch Shimon beschrieb den SSTR5 und den SSTR2 in nahezu allen Wachstumshormon-produzierenden Tumoren (Shimon 2003). Pisarek et al. zeigten immunhistochemisch mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern, dass der SSTR5 häufiger als der SSTR2 exprimiert wird (Pisarek et al. 2009, Pisarek et al. 2010b). Die genaue SSTR-Expression hat großen Einfluss auf die Therapie der GH-produzierenden Hypophysenadenome. Octreotid, welches aktuell zur Behandlung von Wachstumshormon-produzierenden Adenomen eingesetzt wird, bindet den SSTR2 mit sehr hoher und den SSTR5 mit etwas geringerer Affinität (Bruns et al. 2002). Es vermindert bei etwa 70 % der Patienten den GH-Serumspiegel und normalisiert den IGF-1-Wert im Serum (Melmed 2006). Pasireotid hingegen, welches die SSTR1, 2, 3 und 5 mit hoher Affinität bindet (Schmid 2008) und somit auch theoretisch einen größeren inhibitorischen Einfluss auf die GH-Sekretion haben sollte, war in Tiermodellen in der langfristigen Reduktion des GH-Serumspiegels tatsächlich effektiver als Octreotid (Ben-Shlomo und Melmed 2010). In weiterführenden

klinischen Studien wird nun das Potential von Pasireotid im Vergleich zu Octreotid im Menschen geprüft (Petersenn et al. 2010).

In den ACTH-produzierenden Adenomen, die mit Hilfe des UMB1 97-1 untersucht wurden, zeigte sich keine SSTR2-Expression. Der SSTR5 konnte hingegen durch den UMB4 30-5 bei dem Großteil der Tumore festgestellt werden. Hofland et al. beschrieben anhand der mRNA-Expression den SSTR5 als vorherrschenden SSTR-Subtyp in corticotropen Adenomen, wobei die Überzahl der Tumore den SSTR2 ebenfalls, aber mit einer mehrfach geringeren mRNA-Menge, exprimierten (Hofland et al. 2010). Batista et al. konnten mittels Immunhistochemie nachweisen, dass der SSTR5 auch auf der Proteinebene der häufigste Somatostatin-Rezeptor ist (Batista et al. 2006). Interessanterweise zeigten Tateno et al., dass in corticotropen Adenomen, die kein ACTH sezernieren, verglichen mit corticotropen Tumoren, die den Morbus Cushing verursachen, der SSTR1 und der SSTR2 häufiger als der SSTR5 exprimiert werden (Tateno et al. 2009). Diese Daten legen nahe, dass der SSTR5 ein relevantes Ziel der medikamentösen Therapie zur Verminderung der ACTH-Sekretion bei Morbus Cushing-Patienten darstellen kann (Hofland 2008). Octreotid als quasi selektiver SSTR2-Agonist ist ineffektiv in der Behandlung von ACTH-produzierenden Adenomen, die einen Morbus Cushing verursachen (Hofland 2008). Dies erklärt man sich damit, dass es durch die hohe Glucocorticoid-Konzentration im Serum zur Downregulierung der SSTR2-Expression in den corticotropen Zellen kommt (Hofland 2008). Der SSTR5, welcher häufiger in diesen Zellen exprimiert wird als der SSTR2, wird hingegen nicht herunter reguliert (van der Hoek et al. 2005). Pasireotid kann als somit Agonist am SSTR5 und SSTR2 effektiv zur Hemmung der ACTH-Sekretion beim Morbus Cushing eingesetzt werden (van der Hoek et al. 2005, Schmid 2008). Im April 2012 wurde es, nach der vielversprechenden Phase-III-Studie von Colao et al. (Colao et al. 2012), von der EMA EU-weit für die Behandlung des Morbus Cushing zugelassen.

**Neuroendokrine Tumore (NET)** zeigen oft eine Überexpression von Somatostatin-Rezeptoren (Reubi 2003, Gatto und Hofland 2011). Diese bildet die molekulare Basis für die diagnostische und therapeutische Anwendung von Somatostatin-Analoga bei dieser Tumorentität (Lupp et al. 2011). NETs exprimieren in 80-100 % SSTRs, wobei die Häufigkeit und der prozentuale Anteil der einzelnen SSTR-Subtypen zwischen den verschiedenen Tumoren, wie pulmonalen oder gastroenteropankreatischen NETs, variieren (Gatto und Hofland 2011).

In den mit dem UMB4 30-5 und dem UMB1 97-1 untersuchten **neuroendokrinen Tumoren des Darms** konnte eine SSTR2- und SSTR5-Expression in jeweils 73 % der Fälle detektiert

werden, wobei sich die immunhistochemische Färbung des SSTR2 stärker darstellte als die des SSTR5, was möglicherweise auf eine höhere SSTR2-Dichte zurückzuführen ist. Kulaksiz et al. wiesen den SSTR2 in 86 % und den SSTR5 in 83 % der Fälle mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern in immunhistochemischen Untersuchungen nach (Kulaksiz et al. 2002). Die von Schmid et al. untersuchten NETs zeigten eine 63- beziehungsweise 65-prozentige SSTR2- und SSTR5-Expression (Schmid et al. 2012). Sclafani et al. konnten den SSTR2 ebenfalls in 73 %, den SSTR5 hingegen nur in 44 % der analysierten Karzinoide nachweisen (Sclafani et al. 2011). Dass die mRNA des SSTR2 und des SSTR5 in NETs vorkommt, zeigten Hofland und Lamberts. Am häufigsten wurden der SSTR2 (80 %) und der SSTR5 (77 %) exprimiert (Hofland und Lamberts 2003). Somatostatin-Analoga, wie Octreotid, werden häufig zur Therapie von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (GEP-NET) eingesetzt und führen oft zu einer biochemischen und symptomatischen Verbesserung der Krankheit bei den behandelten Patienten. Die Wirkung ist durch die hohe Dichte des SSTR2 in diesen Tumoren zu erklären (Appetecchia und Baldelli 2010). Durch die Detektion von weiteren SSTRs in GEP-NETs eröffnen sich neue Therapiemöglichkeiten. So könnte Pasireotid, welches sich aktuell in der klinischen Prüfung auch für diese Tumoren befindet, als multi-SSTR-Ligand einen Fortschritt in der Diagnostik und Behandlung von GEP-NETs, die andere Somatostatin-Rezeptoren als den SSTR2 exprimieren, ermöglichen (Appetecchia und Baldelli 2010).

Auch in **Lymphknoten- und Lebermetastasen** der neuroendokrinen Tumore konnten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit SSTRs nachweisen. Der SSTR5 kam in 79 % und der SSTR2 in 54 % der Fälle vor. Dabei ist zu bemerken, dass in Lebermetastasen eine höhere SSTR-Expression zu beobachten war als in den Lymphknotenmetastasen. Einige Studien untersuchten ebenfalls die Verteilung der SSTRs in Lebermetastasen. Nasir et al. wiesen den SSTR2 in 81 % und den SSTR5 in 91 % der elf untersuchten Lebermetastasen nach (Nasir et al. 2006). Die immunhistochemischen Färbungen von Kulaksiz et al. detektierten den SSTR2 in sieben von acht und den SSTR5 in sechs von acht Metastasen (Kulaksiz et al. 2002). Die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie nutzt die Expression von SSTRs in Metastasen zum Beispiel für Staging-Untersuchungen der neuroendokrinen Tumore (Frilling et al. 1998). Die vergleichsweise hohe SSTR-Expression in den Metastasen ermöglicht eine gute Ausbreitungsdiagnostik und Therapie von metastasierten neuroendokrinen Tumoren mit Hilfe von Somatostatin-Analoga (Kulaksiz et al. 2002).

In **neuroendokrinen Tumoren der Lunge** ist eine SSTR-Expression ebenfalls bekannt, wobei die SSTR2, 3 und 5 am häufigsten vorkommen (Gatto und Hofland 2011). Die



Untersuchungen mit Hilfe der Antikörper UMB4 30-5 und UMB1 97-1 konnten den SSTR5 in drei von vier Fällen nachweisen, den SSTR2 nur in zwei von vier. Aufgrund der geringen Fallzahl ist eine verallgemeinernde Aussage zur generellen Expression dieser Rezeptoren in NETs der Lunge natürlich nicht möglich. Papotti et al. detektierten mittels Immunhistochemie den SSTR2 in 68 % und den SSTR5 nur in 20 % der 25 untersuchten Lungentumore. Eine groß angelegte Studie von Righi et al. untersuchte 218 NETs der Lunge auf ihre SSTR-Expression. Aber da ihnen für den SSTR5 nur ein sehr unspezifischer Antikörper zur Verfügung stand, konnten sie nur Daten zum SSTR2 und zum SSTR3 erheben. Den SSTR2 konnten sie bei bis zu 71 % der untersuchten Tumore nachweisen (Righi et al. 2010). Bei der Behandlung von Patienten mit neuroendokrinen Tumoren der Lunge mit SSTR2-spezifischen Somatostatin-Analoga, wie Octreotid, kommt es rasch zu einem Rückgang der Wirkung auf den Tumor (Gatto und Hofland 2011). Da Pasireotid auch über andere SSTRs wirkt, könnte es eine Alternative zu Octreotid darstellen.

In den untersuchten **Insulinomen** konnte der SSTR5 in 80 %, der SSTR2 aber nur in 65 % der Fälle detektiert werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden mehrfach beschrieben. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen fanden Kulaksiz et al. den SSTR5 in 78 % und den SSTR2 in 58 % der Insulinome (Kulaksiz et al. 2002). De Sá et al. zeigten mittels PCR eine Expression des SSTR5 in 100 % der Fälle und eine Präsenz des SSTR2 in 89 % der Tumore (de Sá et al. 2006). Außerdem konnten Bertherat et al. nachweisen, dass der SSTR2 und der SSTR5 im Vergleich zu den anderen SSTRs am häufigsten in Insulinomen exprimiert werden (Bertherat et al. 2003). Octreotid hat nur wenig Einfluss auf die Insulin-Sekretion und das Tumorstadium von Insulinomen (de Sá et al. 2006). Unter dem Aspekt, dass der SSTR5 einen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation hat und an der Regulation der Insulin-Sekretion beteiligt ist, könnte Pasireotid eine Therapieoption für Insulinome darstellen (Lamberts et al. 2002a, Lamberts et al. 2002b, de Sá et al. 2006).

Obwohl SSTRs sowohl im exokrinen als auch im endokrinen Pankreas exprimiert werden (Li et al. 2004), konnte in den **Pankreaskarzinomen**, die vom exokrinen Gewebe der Bauchspeicheldrüse abgeleitet sind, weder eine SSTR2- noch eine SSTR5-Expression mit Hilfe der monoklonalen Antikörper UMB4 30-5 und UMB1 97-1 detektiert werden. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass im Tumorgewebe die SSTR-Expression im Vergleich zum Ausgangsgewebe herab reguliert ist. So beschrieben Li et al., dass die mRNA des SSTR2 und des SSTR5 im Vergleich zum umgebenden nicht-neoplastischen Gewebe um ein mehrfaches reduziert ist (Li et al. 2004). Das würde auch erklären, warum die meisten Pankreaskarzinom-

Patienten in klinischen Studien nicht auf eine Therapie mit Somatostatin oder SST-Analoga ansprechen (Canobbio et al. 1992, Li et al. 2004).

In den elf in dieser Arbeit gefärbten **Nierenzellkarzinomen** konnte ebenfalls weder eine SSTR2- noch eine SSTR5-Expression gefunden werden. 1995 analysierten Vikić-Topić et al. die Verteilung der SSTR1 bis 4 in Nierenzellkarzinomen mittels PCR. Laut ihrer Untersuchung wird der SSTR2 am häufigsten exprimiert (Vikić-Topić et al 1995). Studien oder Daten, die eine Aussage zur Präsenz des SSTR5 geben, sind bislang nicht zu finden (Plonowski et al. 2000). Die SSTR-spezifische Diagnostik und Therapie ist bei Nierenzellkarzinomen nur von limitiertem Nutzen und findet keine routinemäßige klinische Anwendung (Freudenberg et al. 2008).

**Phäochromozytome** sind Tumore, die von den chromaffinen Zellen des sympathiko-adrenalen Systems abstammen, überwiegend hormonell aktiv sind und zu einer Katecholamin-Überproduktion führen (Ruggeri et al. 2009). In den immunhistochemischen Untersuchungen detektierte der UMB4 30-5 eine starke SSTR5-Expression bei 82 % der Fälle. Der SSTR2 wurde in 73 % der Tumorgewebe gefunden. In einigen Tumoren konnte sowohl der SSTR5 als auch der SSTR2 nachgewiesen werden, andere hingegen zeigten entweder eine SSTR5- oder eine SSTR2-Expression. Es ist bekannt, dass Phäochromozytome meistens mehr als einen SSTR-Subtyp exprimieren (Mundschenk et al. 2003). Hofland und Lamberts detektierten die mRNA des SSTR2 in 100 % und die des SSTR5 in 73 % der untersuchten Phäochromozytomgewebe (Hofland und Lamberts 2003). Mundschenk et al. konnten mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern den SSTR2 nur in 25 % und den SSTR5 lediglich in 15 % der analysierten Fälle immunhistochemisch nachweisen (Mundschenk et al. 2003). Die Differenz in den Angaben ist unter anderem mit der interindividuellen Variabilität der SSTR-Expression in Phäochromozytomen zu erklären. So weisen zum Beispiel extraadrenale Tumore den SSTR2 deutlich häufiger auf als adenale (Mundschenk et al. 2003).

Auch epitheliale Tumore wie die **Prostatakarzinome** wurden auf eine SSTR5- und SSTR2-Expression untersucht. Bei sieben der neun untersuchten Prostatakarzinome konnte der SSTR5 nachgewiesen werden, eine Expression des SSTR2 zeigte hingegen nur eines der analysierten Karzinome. Dass SSTRs in Prostatakarzinomen exprimiert werden, belegten unter anderen Halmos et al. mittels PCR. Sie fanden den SSTR5 in 63 % und den SSTR2 in 14 % der Fälle (Halmos et al. 2000). Dizeyi et al. untersuchten die SSTR-Expression mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern immunhistochemisch. Sie konnten den SSTR5 jedoch gar nicht detektieren, weder im Prostata-Normal- noch im Tumorgewebe (Dizeyi et al. 2002). Da

aber in anderen Studien wiederholt der SSTR5 nachgewiesen werden konnte (Halmos et al. 2000, Mazzucchelli et al. 2011), ist davon auszugehen, dass der verwendete polyklonale Antikörper nicht sensitiv genug war. Die SSTR-Expression könnte relevant sein zur Diagnostik und Therapie der Prostatakarzinome, für eine genauere Einschätzung sind aber weitere Studien an größeren Patientenkohorten nötig (Mazzucchelli et al. 2011).

Etwa 60 bis 70 % aller **Mammakarzinome** exprimieren Somatostatin-Rezeptoren (Watt et al. 2008). Die immunhistochemischen Färbungen mit Hilfe des UMB4 30-5 und UMB1 97-1 konnten den SSTR5 in 90 % und den SSTR2 in 20 % der untersuchten zehn Fälle nachweisen. Vergleichbare Ergebnisse berichteten auch Schulz et al.; sie konnten den SSTR2 in 45 % und den SSTR5 in 70 % der Karzinome mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern immunhistochemisch detektieren. Insgesamt konnten sie zeigen, dass 80 % der Mammakarzinome den SSTR2 und/oder den SSTR5 exprimieren (Schulz et al. 2002a). Diese Ergebnisse legen nahe, Octreotid-Derivate zur Diagnostik oder Therapie dieser Tumore zu verwenden. Während der Einsatz der Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie in der primären Diagnostik jedoch aufgrund der mäßigen Sensitivität und durch weitere Einflussfaktoren limitiert wird, kann die Untersuchung des immunhistochemischen SSTR-Expressionsprofils von Nutzen sein. Es können so SSTR2- beziehungsweise SSTR5-positive Fälle herausgefiltert und weiteren therapeutischen und diagnostischen Interventionen mittels Radionuklid- oder Chemotherapeutika-gekoppelten Somatostatin-Analoga zugeführt werden (Schulz et al. 2002a).

In den untersuchten elf **Ovarialkarzinomen** konnte der SSTR5 bei 70 % der Fälle nachgewiesen werden, der SSTR2 hingegen gar nicht. Verallgemeinernde Aussagen sind jedoch aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Fälle nur schwer möglich. Hall et al. analysierten mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern 63 Ovarialkarzinome immunhistochemisch. Bei dieser vergleichsweise großen Anzahl der Fälle konnten sie bei 77 % den SSTR2 und bei 71 % den SSTR5 detektieren (Hall et al. 2002). Schulz et al. fanden hingegen eine SSTR2-Expression bei nur 28 % und eine SSTR5-Expression bei 21 % der 47 von ihnen untersuchten Tumore. Sie verwendeten ebenfalls polyklonale Antikörper zur immunhistochemischen Färbung (Schulz et al. 2002b). Die große Differenz zwischen diesen Ergebnissen könnte auf die unterschiedliche Qualität der verschiedenen verwendeten polyklonalen Antikörper-Seren zurückzuführen sein oder damit zusammenhängen, dass die SSTR-Expression bei Ovarialkarzinomen stark interindividuell schwankt. Mit Hilfe von nun verfügbaren monoklonalen Antikörpern, die unbegrenzt in gleichbleibender Qualität hergestellt werden können, sollten weitere Untersuchungen zur Häufigkeit der SSTR2- und

SSTR5-Expression in Ovarialkarzinomen durchgeführt werden. Diese würden dann eine definitivere Aussage zum Expressionsprofil zulassen und so Schlussfolgerungen bezüglich der therapeutischen Anwendbarkeit von Somatostatin-Analoga ermöglichen.

Die untersuchten **Zervixkarzinome** zeigten ebenfalls keinerlei SSTR2-Expression, aber bei mehr als der Hälfte der Tumore konnte der SSTR5 nachgewiesen werden. Schulz et al. detektierten hingegen immunhistochemisch mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern den SSTR2 in 57 % der Fälle, den SSTR5 konnten sie jedoch in keinem der 21 analysierten Tumorgewebe nachweisen (Schulz et al. 2003). Die Untersuchungsergebnisse lassen sich aufgrund der geringen Fallzahlen nur schlecht vergleichen. Zum SSTR-Expressionsprofil von Karzinomen der Zervix uteri wurden bislang erst wenige Studien veröffentlicht. Es wäre somit interessant, eine weiterführende Analyse an einer größeren Anzahl von Zervixkarzinomen durchzuführen.

## 7 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine ausführliche Charakterisierung des neu entwickelten monoklonalen Kaninchen-Anti-hSSTR5-Antikörpers UMB4 30-5. Der Nachweis der Spezifität des monoklonalen Antikörpers UMB4 30-5 konnte sowohl durch immunzytochemische Untersuchungen an stabil transfizierten Zellen, Western-Blot-Analysen, Präabsorptionskontrollen als auch mittels immunhistochemischer Färbungen erbracht werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 sein Antigen, den Somatostatin-Rezeptor 5, mit hoher Spezifität in immunzytochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen nachweist. Desweiteren ist der UMB4 30-5 imstande, den SSTR5 aus Zell- und Gewebekomponenten in der Western-Blot-Analyse spezifisch zu detektieren. Der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 ermöglicht eine gute Detektion des humanen Somatostatin-Rezeptors 5 in in Formalin fixierten und in Paraffinblöcken eingebetteten humanen Geweben unter Verwendung von Methoden, die routinemäßig während histopathologischer Untersuchungen von Tumorgewebe zum Einsatz kommen.

Der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 ist der erste Anti-SSTR5-Antikörper, der den membranständigen Somatostatin-Rezeptor 5 in humanen Normalgeweben verlässlich und spezifisch detektiert (Lupp et al. 2011). Dadurch konnten erste neue Einblicke in die Expression und in die Funktion des SSTR5 gewonnen werden, welche in weiterführenden Untersuchungen vertieft werden können.

Durch immunhistochemische Färbungen mit Hilfe des monoklonalen Anti-hSSTR5-Antikörpers UMB4 30-5 und des monoklonalen Anti-SSTR2-Antikörpers UMB1 97-1 konnte die hohe Prävalenz der beiden Rezeptoren SSTR5 und SSTR2 in Hypophysenadenomen, neuroendokrinen Tumoren und Phäochromozytomen bestätigt werden. Desweiteren konnte die starke SSTR5-Expression der ACTH-produzierenden, Morbus Cushing verursachenden Hypophysenadenome gezeigt werden. Diese exprimieren den SSTR2 nicht, deshalb fanden die bislang verfügbaren SSTR2-spezifischen Somatostatin-Analoga, wie Octreotid, keine Anwendung bei diesen Tumoren. Auch in epithelialen Tumoren, wie Prostata-, Zervix- und Mammakarzinomen, konnte ein relevantes SSTR5-Vorkommen detektiert werden. Diese Ergebnisse könnten neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten bei der Behandlung dieser Tumorarten eröffnen.

Mit der Möglichkeit des spezifischen Nachweises des SSTR5 durch den monoklonalen Antikörper UMB4 30-5 ergeben sich neue diagnostische Möglichkeiten, insbesondere in Bezug auf die Evaluierung des SSTR5-Rezeptorstatus verschiedener Gewebe. Denn im Gegensatz zu den derzeit verfügbaren polyklonalen Anti-SSTR5-Antikörperseren kann der UMB4 30-5 in unbegrenzter Menge, für unbeschränkte Zeit, in immer gleichbleibender hoher Qualität produziert werden. Somit kann der monoklonale Anti-hSSTR5-Antikörper UMB4 30-5 unter anderem im Rahmen von routinemäßigen histopathologischen Untersuchungen von verschiedenen Tumorentitäten Anwendung finden. Der Einsatz des UMB4 30-5 in Kombination mit dem monoklonalen Anti-SSTR2-Antikörper UMB1 97-1 und das so ermittelte SSTR-Expressionsprofil der Tumorzellen kann eine Entscheidungshilfe für anschließende diagnostische und therapeutische Verfahren darstellen und unter anderem genutzt werden, um zu beurteilen, ob ein Patient einer Octreotid- oder einer Pasireotid-Therapie zugeführt werden sollte.

Der monoklonale Antikörper UMB4 30-5 kann somit von großem Nutzen sein bei der Charakterisierung des SSTR5-Rezeptorstatus, sowohl in humanen Normalgeweben, die in der klinischen Forschung untersucht werden, als auch in neoplastischen Geweben für Entscheidungen bezüglich der onkologischen Diagnostik und Therapie.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K, Hrsg. 2009. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Zehnte Aufl. München: Urban & Fischer Verlag, 642-643.
- Appetecchia M, Baldelli R. 2010. Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours, current aspects and new perspectives. *J Exp Clin Cancer Res*, 29(1):19-32.
- Arimura A, Sato H, Dupont A, Nishi N, Schally AV. 1975. Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. *Science*, 189(4207):1007-1009.
- Arnaldi G, Boscaro M. 2010. Pasireotide for the treatment of Cushing's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 19(7):889-898.
- Atiya AW, Moldovan S, Adrian TE, Coy D, Walsh J, Brunicardi FC. 1997. Intraislet somatostatin inhibits insulin (via a subtype-2 somatostatin receptor) but not islet amyloid polypeptide secretion in the isolated perfused human pancreas. *J Gastrointest Surg*, 1(3):251-256.
- Badway AC, West FM, Tente SM, Blake AD. 2004. Somatostatin regulates intracellular signaling in human carotid endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 319(4):1222-1227.
- Balster DA, O'Dorisio MS, Summers MA, Turman MA. 2001. Segmental expression of somatostatin receptor subtypes sst(1) and sst(2) in tubules and glomeruli of human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(3):F457-465.
- Batista DL, Zhang X, Gejman R, Ansell PJ, Zhou Y, Johnson SA, Swearingen B, Hedley-Whyte ET, Stratakis CA, Klibanski A. 2006. The effects of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(11):4482-4488.
- Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless. 1982. SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci*, 31(11):1133-1140.

- Ben-Shlomo A, Melmed S. 2008. Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 37(1):101-122.
- Ben-Shlomo A, Melmed S. 2010. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 21(3):123-133.
- Bertherat J, Tenenbaum F, Perlemoine K, Videau C, Alberini JL, Richard B, Dousset B, Bertagna X, Epelbaum J. 2003. Somatostatin receptors 2 and 5 are the major somatostatin receptors in insulinomas: an in vivo and in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(11):5353-5360.
- Bhandari S, Watson N, Long E, Sharpe S, Zhong W, Xu SZ, Atkin SL. 2008. Expression of somatostatin and somatostatin receptor subtypes 1-5 in human normal and diseased kidney. *J Histochem Cytochem*, 56(8):733-743.
- Boy C, Heusner TA, Poeppel TD, Redmann-Bischofs A, Unger N, Jentzen W, Brandau W, Mann K, Antoch G, Bockisch A, Petersenn S. 2011. <sup>68</sup>Ga-DOTATOC PET/CT and somatostatin receptor (sst1-sst5) expression in normal human tissue: correlation of sst2 mRNA and SUVmax. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 38(7):1224-1236.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179(68):77-79.
- Bruns C, Weckbecker G, Raulf F, Kaupmann K, Schoeffter P, Hoyer D, Lübbert H. 1994. Molecular pharmacology of somatostatin-receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci*, 733:138-146.
- Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G. 2002. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol*, 146(5):707-716.
- Buchan AM, Lin CY, Choi J, Barber DL. 2002. Somatostatin, acting at receptor subtype 1, inhibits Rho activity, the assembly of actin stress fibers, and cell migration. *J Biol Chem*, 277(32):28431-28438.



- Burgus R, Ling N, Butcher M, Guillemin R. 1973. Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70(3):684-688.
- Burry RW. 2011. Controls for immunocytochemistry: an update. *J Histochem Cytochem*, 59(1):6-12.
- Buscail L, Delesque N, Estève JP, Saint-Laurent N, Prats H, Clerc P, Robberecht P, Bell GI, Liebow C, Schally AV. 1994. Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(6):2315-2319.
- Canobbio L, Boccardo F, Cannata D, Gallotti P, Epis R. 1992. Treatment of advanced pancreatic carcinoma with the somatostatin analogue BIM 23014. Preliminary results of a pilot study. *Cancer*, 69(3):648-650.
- Casarini AP, Jallad RS, Pinto EM, Soares IC, Nonogaki S, Giannella-Neto D, Musolino NR, Alves VA, Bronstein MD. 2009. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary*, 12(4):297-303.
- Casini Raggi C, Calabrò A, Renzi D, Briganti V, Cianchi F, Messerini L, Valanzano R, Cameron Smith M, Cortesini C, Tonelli F, Serio M, Maggi M, Orlando C. 2002. Quantitative evaluation of somatostatin receptor subtype 2 expression in sporadic colorectal tumor and in the corresponding normal mucosa. *Clin Cancer Res*, 8(2):419-427.
- Cescato R, Schulz S, Waser B, Eltschinger V, Rivier JE, Wester HJ, Culler M, Ginj M, Liu Q, Schonbrunn A, Reubi JC. 2006. Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists. *J Nucl Med*, 47(3):502-511.
- Colao A, Petersenn S, Newell-Price J, Findling JW, Gu F, Maldonado M, Schoenherr U, Mills D, Salgado LR, Biller BM. 2012. A 12-month phase 3 study of pasireotide in Cushing's disease. *N Engl J Med*, 366(10):914-924.
- Creutzfeldt W, Lembcke B, Fölsch UR, Schleser S, Koop I. 1987. Effect of somatostatin analogue (SMS 201-995, Sandostatin) on pancreatic secretion in humans. *Am J Med*, 82(5B):49-54.

- Csaba Z, Dournaud P. 2001. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides*, 35(1):1-23.
- Curtis SB, Hewitt J, Yakubovitz S, Anzarut A, Hsiang YN, Buchan AM. 2000. Somatostatin receptor subtype expression and function in human vascular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(6):H1815-1822.
- Dalm VA, Hofland LJ, Ferone D, Croxen R, Lamberts SW, van Hagen PM. 2003a. The role of somatostatin and somatostatin analogs in the pathophysiology of the human immune system. *J Endocrinol Invest*, 26(8):94-102.
- Dalm VA, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Achilefu S, Houtsmuller AB, Pols DH, van der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. 2003b. Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285(2):E344-353.
- de Herder WW, Lamberts SW. 2002. Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses. *Curr Opin Oncol*, 14(1):53-57.
- de Sá SV, Corrêa-Giannella ML, Machado MC, de Souza JJ, Pereira MA, Patzina RA, Siqueira SA, Machado MC, Giannella-Neto D. 2006. Somatostatin receptor subtype 5 (SSTR5) mRNA expression is related to histopathological features of cell proliferation in insulinomas. *Endocr Relat Cancer*, 13(1):69-78.
- de StGroth SF, Scheidegger D. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods*, 35(1-2):1-21.
- Dizeyi N, Konrad L, Bjartell A, Wu H, Gadaleanu V, Hansson J, Helboe L, Abrahamsson PA. 2002. Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines. *Urol Oncol*, 7(3):91-98.
- Dübel S, Rohrbach P, Schmiedl A. 2004. Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen? Rekombinante Antikörper. *Biol Unserer Zeit*, 34(6):372-379.
- Evans AA, Crook T, Laws SA, Gough AC, Royle GT, Primrose JN. 1997. Analysis of somatostatin receptor subtype mRNA expression in human breast cancer. *Br J Cancer*, 75(6):798-803.

- Feelders RA, de Bruin C, Pereira AM, Romijn JA, Netea-Maier RT, Hermus AR, Zelissen PM, van Heerebeek R, de Jong FH, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ, Lamberts SW. 2010. Pasireotide alone or with cabergoline and ketoconazole in Cushing's disease. *N Engl J Med*, 362(19):1846-1848.
- Ferone D, van Hagen PM, Semino C, Dalm VA, Barreca A, Colao A, Lamberts SW, Minuto F, Hofland LJ. 2004. Somatostatin receptor distribution and function in immune system. *Dig Liver Dis*, 36 (Suppl 1):68-77.
- Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, Schulz S. 2008. Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(11):4519-4524.
- Fougner SL, Borota OC, Berg JP, Hald JK, Ramm-Petersen J, Bollerslev J. 2008. The clinical response to somatostatin analogues in acromegaly correlates to the somatostatin receptor subtype 2a protein expression of the adenoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 68(3):458-465.
- Frei N, Weissenberger J, Beck-Sickinger AG, Höfliger M, Weis J, Imboden H. 2001. Immunocytochemical localization of angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II with monoclonal antibodies in the rat adrenal gland. *Regul Pept*, 101(1-3):149-155.
- Freudenberg LS, Gauler T, Görges R, Bauer S, Stergar H, Antoch G, Bockisch A, Schütte J. 2008. Somatostatin receptor scintigraphy in advanced renal cell carcinoma. Results of a phase II-trial of somatostatin analogue therapy in patients with advanced RCC. *Nuklearmedizin*, 47(3):127-131.
- Frilling A, Malago M, Martin H, Broelsch CE. 1998. Use of somatostatin receptor scintigraphy to image extrahepatic metastases of neuroendocrine tumors. *Surgery*, 124(6):1000-1004.
- Ganten D, Ruckpaul K. 2008. *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Dritte Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
- Gatto F, Hofland LJ. 2011. The role of somatostatin and dopamine D2 receptors in endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*, 18(6):R233-251.

- Gaudillère A, Bernard C, Abello J, Schmitt D, Claudy A, Misery L. 1999. Human normal dermal fibroblasts express somatostatin receptors. *Exp Dermatol*, 8(4):267-273.
- Ghamrawy CE, Rabourdin-Combe C, Krantic S. 1999. sst5 somatostatin receptor mRNA induction by mitogenic activation of human T-lymphocytes. *Peptides*, 20(3):305-311.
- Goodman RH, Aron DC, Roos BA. 1983. Rat pre-prosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes. *J Biol Chem*, 258(9):5570-5573.
- Grozinsky-Glasberg S, Grossman AB, Korbonits M. 2008. The role of somatostatin analogues in the treatment of neuroendocrine tumours. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2):238-250.
- Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. 2005. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Fünfte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Hall GH, Turnbull LW, Richmond I, Helboe L, Atkin SL. 2002. Localisation of somatostatin and somatostatin receptors in benign and malignant ovarian tumours. *Br J Cancer*, 87(1):86-90.
- Halmos G, Schally AV, Sun B, Davis R, Bostwick DG, Plonowski A. 2000. High expression of somatostatin receptors and messenger ribonucleic acid for its receptor subtypes in organ-confined and locally advanced human prostate cancers. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(7):2564-2571.
- Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Papakonstanti E, Stournaras C, Emmanouel DS, Castanas E. 1996. Identification and characterization of opioid and somatostatin binding sites in the opossum kidney (OK) cell line and their effect on growth. *J Cell Biochem*, 63(4):410-421.
- Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kampa M, Panagiotou S, Martin PM, Loukas S, Castanas E. 2000. Somatostatin and opioid receptors in mammary tissue. Role in cancer cell growth. *Adv Exp Med Biol*, 480:55-63.
- Helboe L, Møller M, Nørregaard L, Schiødt M, Stidsen CE. 1997. Development of selective antibodies against the human somatostatin receptor subtypes sst1-sst5. *Brain Res Mol Brain Res*, 49(1-2):82-88.

- Helboe L, Møller M. 2000. Localization of somatostatin receptors at the light and electron microscopical level by using antibodies raised against fusion proteins. *Prog Histochem Cytochem*, 35(1):3-64.
- Hick C, Hick A. 2009. *Intensivkurs Physiologie*. Sechste Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.
- Hofland LJ, Lamberts SW. 2003. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev*, 24(1):28-47.
- Hofland LJ. 2008. Somatostatin and somatostatin receptors in Cushing's disease. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2):199-205.
- Hofland LJ, Lamberts SW, Feelders RA. 2010. Role of somatostatin receptors in normal and tumoral pituitary corticotropic cells. *Neuroendocrinology*, 92 (Suppl 1):11-16.
- Hökfelt T, Efendić S, Hellerström C, Johansson O, Luft R, Arimura A. 1975. Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A1-cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, 200:5-41.
- Horsmans Y, Hu K, Ruffin M, Wang Y, Song D, Bouillaud E, Wang Y, Mazur D, Botha FP, Heuman DM. 2012. Effect of hepatic impairment on the pharmacokinetics of pasireotide (SOM230): Results from a multicenter phase I study. *J Clin Pharmacol*, 52(4):552-558.
- Jones CR, Millar JA, Lawrie C, Sumner DJ, Reid JL. 1984. Specific inhibition of aldosterone responses to endogenous and exogenous angiotensin II by somatostatin. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 21(3):279-284.
- Kaltsas GA, Stefanidou Z, Papadogias D, Grossman AB. 2002. Treatment of advanced neuroendocrine tumours with the radiolabelled somatostatin analogue octreotide. *Hormones (Athens)*, 1(3):149-156.
- Karalis K, Mastorakas G, Chrousos GP, Tolis G. 1994. Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J Clin Invest*, 93(5):2000-2006.
- Kimura N, Schindler M, Kasai N, Kimura I. 2001. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor type 2A in rat and human tissues. *Endocr J*, 48(1):95-102.

- Koerker DJ, Ruch W, Chideckel E, Palmer J, Goodner CJ, Ensnick J, Gale CC. 1974. Somatostatin: hypothalamic inhibitor of the endocrine pancreas. *Science*, 184(4135):482-484.
- Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495-497.
- Körner M, Waser B, Schonbrunn A, Perren A, Reubi JC. 2012. Somatostatin receptor subtype 2A immunohistochemistry using a new monoclonal antibody selects tumors suitable for in vivo somatostatin receptor targeting. *Am J Surg Pathol*, 36(2):242-252.
- Kraenzlin ME, Wood SM, Neufeld M, Adrian TE, Bloom SR. 1985. Effect of long acting somatostatin-analogue, SMS 201 995, on gut hormone secretion in normal subjects. *Experientia*, 41(6):738-740.
- Kulaksiz H, Eissele R, Rössler D, Schulz S, Höllt V, Cetin Y, Arnold R. 2002. Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut*, 50(1):52-60.
- Kumar U, Laird D, Srikant CB, Escher E, Patel YC. 1997. Expression of the five somatostatin receptor (SSTR1-5) subtypes in rat pituitary somatotrophes: quantitative analysis by double-layer immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*, 138(10):4473-4476.
- Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC, Patel YC. 1999. Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. *Diabetes*, 48(1):77-85.
- Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. 1996. Octreotide. *N Engl J Med*, 334(4):246-254.
- Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ. 2002a. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab*, 13(10):451-457.
- Lamberts SW, van der Lely AJ, Hofland LJ. 2002b. New somatostatin analogs: will they fulfil old promises? *Eur J Endocrinol*, 146(5):701-705.

- Li M, Li W, Kim HJ, Yao Q, Chen C, Fisher WE. 2004. Characterization of somatostatin receptor expression in human pancreatic cancer using real-time RT-PCR. *J Surg Res*, 119(2):130-137.
- Liebow C, Reilly C, Serrano M, Schally AV. 1989. Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(6):2003-2007.
- Lightman SL, Fox P, Dunne MJ. 1986. The effect of SMS 201-995, a long-acting somatostatin analogue, on anterior pituitary function in healthy male volunteers. *Scand J Gastroenterol (Suppl)*, 119:84-95.
- Lupp A, Hunder A, Petrich A, Nagel F, Doll C, Schulz S. 2011. Reassessment of sst5 somatostatin receptor expression in normal and neoplastic human tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-4. *Neuroendocrinology*, 94(3):255-264.
- Manjila S, Wu OC, Khan FR, Khan MM, Arafah BM, Selman WR. 2010. Pharmacological management of acromegaly: a current perspective. *Neurosurg Focus*, 29(4):E14.
- Maurer R, Reubi JC. 1986. Somatostatin receptors in the adrenal. *Mol Cell Endocrinol*, 45(1):81-90.
- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Meneghelli V, Nussdorfer GG. 1992. Evidence that endogenous somatostatin (SRIF) exerts a tonic inhibitory effect on the rat renin-angiotensin-aldosterone system. *In Vivo*, 6(1):9-12.
- Mazzucchelli R, Morichetti D, Scarpelli M, Bono AV, Lopez-Beltran A, Cheng L, Kirkali Z, Montironi R. 2011. Somatostatin receptor subtypes in hormone-refractory (castration-resistant) prostatic carcinoma. *Asian J Androl*, 13(2):242-247.
- Melmed S. 2006. Medical progress: Acromegaly. *N Engl J Med*, 355(24):2558-2573.
- Modlin IM, Pavel M, Kidd M, Gustafsson BI. 2010. Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment Pharmacol Ther*, 31(2):169-188.
- Montminy MR, Goodman RH, Horovitch SJ, Habener JF. 1984. Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(11):3337-3340.

- Mundschenk J, Unger N, Schulz S, Höllt V, Schulz S, Steinke R, Lehnert H. 2003. Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytoma: subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(11):5150-5157.
- Murphy E, Prommer EE, Mihalyo M, Wilcock A. 2010. Octreotide. *J Pain Symptom Manage*, 40(1):142-148.
- Nasir A, Stridsberg M, Strosberg J, Su PH, Livingston S, Malik HA, Kelley ST, Centeno BA, Coppola D, Malafa ME, Yeatman TJ, Kvols LK. 2006. Somatostatin receptor profiling in hepatic metastases from small intestinal and pancreatic neuroendocrine neoplasms: immunohistochemical approach with potential clinical utility. *Cancer Control*, 13(1):52-60.
- Noll S, Schaub-Kuhnen S. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*. München, Jena: Urban & Fischer-Verlag.
- Oberg KE. 2012. The management of neuroendocrine tumours: current and future medical therapy options. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 24(4):282-293.
- O'Toole D, Ducreux M, Bommelaer G, Wemeau JL, Bouché O, Catus F, Blumberg J, Ruszniewski P. 2000. Treatment of carcinoid syndrome: a prospective crossover evaluation of lanreotide versus octreotide in terms of efficacy, patient acceptability, and tolerance. *Cancer*, 88(4):770-776.
- Panetta R, Patel YC. 1995. Expression of mRNA for all five human somatostatin receptors (hSSTR1-5) in pituitary tumors. *Life Sci*, 56(5):333-342.
- Patel YC. 1992. General aspects of the biology and function of somatostatin. *Basic and clinical aspects of neuroscience*, Vol. 4:1-16.
- Patel YC, Srikant CB. 1997. Somatostatin receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 8(10):398-405.
- Patel YC. 1999. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, 20(3):157-198.
- Penman E, Wass JA, Butler MG, Penny ES, Price J, Wu P, Rees LH. 1983. Distribution and characterisation of immunoreactive somatostatin in human gastrointestinal tract. *Regul Pept*, 7(1):53-65.



- Petersen H, Bizec JC, Schuetz H, Delporte ML. 2011. Pharmacokinetic and technical comparison of Sandostatin® LAR® and other formulations of long-acting octreotide. *BMC Res Notes*, 4:344.
- Petersenn S, Schopohl J, Barkan A, Mohideen P, Colao A, Abs R, Buchelt A, Ho YY, Hu K, Farrall AJ, Melmed S, Biller BM. 2010. Pasireotide (SOM230) demonstrates efficacy and safety in patients with acromegaly: a randomized, multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(6):2781-2789.
- Pisarek H, Stepień T, Kubiak R, Pawlikowski M. 2008. Somatostatin receptors in human adrenal gland tumors--immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol*, 46(3):345-351.
- Pisarek H, Pawlikowski M, Kunert-Radek J, Radek M. 2009. Expression of somatostatin receptor subtypes in human pituitary adenomas -- immunohistochemical studies. *Endokrynol Pol*, 60(4):240-251.
- Pisarek H, Pawlikowski M, Kunert-Radek J, Kubiak R, Winczyk K. 2010a. SSTR1 and SSTR5 subtypes are the dominant forms of somatostatin receptor in neuroendocrine tumors. *Folia Histochem Cytobiol*, 48(1):142-147.
- Pisarek H, Pawlikowski M, Kunert-Radek J, Winczyk K. 2010b. Does the response of GH-secreting pituitary adenomas to octreotide depend on the cellular localization of the somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5? *Endokrynol Pol*, 61(2):178-181.
- Plonowski A, Schally AV, Nagy A, Kiaris H, Hebert F, Halmos G. 2000. Inhibition of metastatic renal cell carcinomas expressing somatostatin receptors by a targeted cytotoxic analogue of somatostatin AN-238. *Cancer Res*, 60(11):2996-3001.
- Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Grimelius L, Oberg K, Janson ET. 2000. Expression of the five different somatostatin receptor subtypes in endocrine cells of the pancreas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 8(2):126-132.
- Pradayrol L, Jomvall H, Mutt V, Ribet A. 1980. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett*, 109(1):55-58.
- Prasad V, Fetscher S, Baum RP. 2007. Changing role of somatostatin receptor targeted drugs in NET: Nuclear Medicine's view. 2007. *J Pharm Pharm Sci*, 10(2):321s-337s.

- Pyronnet S, Bousquet C, Najib S, Azar R, Laklai H, Susini C. 2008. Antitumor effects of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2):230-237.
- Ray C, Carney S, Morgan T, Gillies A. 1993. Somatostatin as a modulator of distal nephron water permeability. *Clin Sci (Lond)*, 84(4):455-460.
- Rehm H, Letzel T. 2010. *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*. Sechste Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Reichlin S. 1983. Somatostatin. *N Engl J Med*, 309(24, 25):1495-1501, 1556-1563.
- Reisine T. 1995. Somatostatin. *Cell Mol Neurobiol*, 15(6):597-614.
- Reisine T, Bell GI. 1995. Molecular properties of somatostatin receptors. *Neuroscience*, 67(4):777
- Remmele W, Stegner H. 1987. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Der Pathologe*, 8:138-140.
- Reubi JC, Horisberger U, Klijn JG, Foekens JA. 1991. Somatostatin receptors in differentiated ovarian tumors. *Am J Pathol*, 138(5):1267-1272.
- Reubi JC, Laissue J, Krenning E, Lamberts SW. 1992. Somatostatin receptors in human cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43(1-3):27-35.
- Reubi JC, Horisberger U, Studer UE, Waser B, Laissue JA. 1993. Human kidney as target for somatostatin: high affinity receptors in tubules and vasa recta. *J Clin Endocrinol Metab*, 77(5):1323-1328.
- Reubi JC, Kappeler A, Waser B, Schonbrunn A, Laissue J. 1998. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor sst2A in human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(10):3746-3749.
- Reubi JC, Laissue JA, Waser B, Steffen DL, Hipkin RW, Schonbrunn A. 1999. Immunohistochemical detection of somatostatin sst2a receptors in the lymphatic, smooth muscular, and peripheral nervous systems of the human gastrointestinal tract: facts and artifacts. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(8):2942-2950.

- Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. 2001. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, 28(7):836-846.
- Reubi JC. 2003. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev*, 24(4):389-427.
- Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, Urbain D, Kumar U, Bioulac-Sage P, Pinzani M, Rosenbaum J, Geerts A. 2004. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma. *Gut*, 53(8):1180-1189.
- Righi L, Volante M, Tavaglione V, Billè A, Daniele L, Angusti T, Inzani F, Pelosi G, Rindi G, Papotti M. 2010. Somatostatin receptor tissue distribution in lung neuroendocrine tumours: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 218 'clinically aggressive' cases. *Ann Oncol*, 21(3):548-555.
- Robbins RJ. 1996. Somatostatin and Cancer. *Metabolism*, 45(8):98-100.
- Ruggeri RM, Ferraù F, Campenni A, Simone A, Barresi V, Giuffrè G, Tuccari G, Baldari S, Trimarchi F. 2009. Immunohistochemical localization and functional characterization of somatostatin receptor subtypes in a corticotropin releasing hormone-secreting adrenal pheochromocytoma: review of the literature and report of a case. *Eur J Histochem*, 53(1):1-6.
- Saper CB, Sawchenko PE. 2003. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 465(2):161-163.
- Schmid HA, Schoeffter P. 2004. Functional activity of the multiligand analog SOM230 at human recombinant somatostatin receptor subtypes supports its usefulness in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*, 80(Suppl 1):47-50.
- Schmid HA. 2008. Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2):69-74.
- Schmid HA, Lambertini C, van Vugt HH, Barzaghi-Rinaudo P, Schäfer J, Hillenbrand R, Sailer AW, Kaufmann M, Nuciforo P. 2012. Monoclonal antibodies against the human somatostatin receptor subtypes 1-5: development and immunohistochemical application in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*, 95(3):232-247.

- Schmidt A, Pleiner J, Schaller G, Roden M, Dallinger S, Mayer G, Schmetterer L, Wolzt M. 2002. Renal hemodynamic effects of somatostatin are not related to inhibition of endogenous insulin release. *Kidney Int*, 61(5):1788-1793.
- Schonbrunn A, Tashjian H Jr. 1978. Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem*, 253(18):6473-6483.
- Schonbrunn A. 2008. Selective agonism in somatostatin receptor signaling and regulation. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2):35-39.
- Schulz S, Schreff M, Schmidt H, Händel M, Przewlocki R, Höllt V. 1998a. Immunocytochemical localization of somatostatin receptor sst2A in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci*, 10(12):3700-3708.
- Schulz S, Schulz S, Schmitt J, Wiborny D, Schmidt H, Olbricht S, Weise W, Roessner A, Gramsch C, Höllt V. 1998b. Immunocytochemical detection of somatostatin receptors sst1, sst2A, sst2B, and sst3 in paraffin-embedded breast cancer tissue using subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res*, 4(9):2047-2052.
- Schulz S, Helmholz T, Schmitt J, Franke K, Otto HJ, Weise W. 2002a. True positive somatostatin receptor scintigraphy in primary breast cancer correlates with expression of sst2A and sst5. *Breast Cancer Res Treat*, 72(3):221-226.
- Schulz S, Schmitt J, Quednow C, Roessner A, Weise W. 2002b. Immunohistochemical detection of somatostatin receptors in human ovarian tumors. *Gynecol Oncol*, 84(2):235-240.
- Schulz S, Schmitt J, Weise W. 2003. Frequent expression of immunoreactive somatostatin receptors in cervical and endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 89(3):385-390.
- Schulz S, Röcken C, Mawrin C, Weise W, Höllt V, Schulz S. 2004. Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res*, 10(24):8235-8242.
- Schulz S, Röcken C, Ebert MP, Schulz S. 2006. Immunocytochemical identification of low-affinity NTS2 neurotensin receptors in parietal cells of human gastric mucosa. *J Endocrinol*, 191(1):121-128.

- Sclafani F, Carnaghi C, Di Tommaso L, Rodari M, Destro A, Rimassa L, Giordano L, Chiti A, Roncalli M, Santoro A. 2011. Detection of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 by somatostatin receptor scintigraphy and immunohistochemistry: clinical implications in the diagnostic and therapeutic management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Tumori*, 97(5):620-628.
- Serri O, Brazeau P, Kachra Z, Posner B. 1992. Octreotide inhibits insulin-like growth factor-I hepatic gene expression in the hypophysectomized rat: evidence for a direct and indirect mechanism of action. *Endocrinology*, 130(4):1816-1821.
- Shimon I. 2003. Somatostatin receptors in pituitary and development of somatostatin receptor subtype-selective analogs. *Endocrine*, 20(3):265-269.
- Sinisi AA, Bellastella A, Prezioso D, Nicchio MR, Lotti T, Salvatore M, Pasquali D. 1997. Different expression patterns of somatostatin receptor subtypes in cultured epithelial cells from human normal prostate and prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(8):2566-2569.
- Sonnenberg GE, Keller U, Perruchoud A, Burckhardt D, Gyr K. 1981. Effect of somatostatin on splanchnic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver and in normal subjects. *Gastroenterology*, 80(3):526-532.
- Sternini C, Wong H, Wu SV, de Giorgio R, Yang M, Reeve J Jr, Brecha NC, Walsh JH. 1997. Somatostatin 2A receptor is expressed by enteric neurons, and by interstitial cells of Cajal and enterochromaffin-like cells of the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol*, 386(3):396-408.
- Stroh T, Jackson AC, Sarret P, Dal Farra C, Vincent JP, Kreienkamp HJ, Mazella J, Beaudet A. 2000. Intracellular dynamics of sst5 receptors in transfected COS-7 cells: maintenance of cell surface receptors during ligand-induced endocytosis. *Endocrinology*, 141(1):354-365.
- Strowski MZ, Dashkevicz MP, Parmar RM, Wilkinson H, Kohler M, Schaeffer JM, Blake AD. 2002. Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 inhibit corticotropin-releasing hormone-stimulated adrenocorticotropin secretion from AtT-20 cells. *Neuroendocrinology*, 75(6):339-346.
- Susini C, Buscail L. 2006. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann Oncol*, 17(12):1733-1742.

- Talme T, Ivanoff J, Hägglund M, Van Neerven RJ, Ivanoff A, Sundqvist KG. 2001. Somatostatin receptor (SSTR) expression and function in normal and leukaemic T-cells. Evidence for selective effects on adhesion to extracellular matrix components via SSTR2 and/or 3. *Clin Exp Immunol*, 125(1):71-79.
- Taniyama Y, Suzuki T, Mikami Y, Moriya T, Satomi S, Sasano H. 2005. Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr J*, 52(5):605-611.
- Tateno T, Kato M, Tani Y, Oyama K, Yamada S, Hirata Y. 2009. Differential expression of somatostatin and dopamine receptor subtype genes in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors and silent corticotroph adenomas. *Endocr J*, 56(4):579-584.
- Teunissen JJ, Kwekkeboom DJ, Valkema R, Krenning EP. 2011. Nuclear medicine techniques for the imaging and treatment of neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*, 18Suppl1:27-51.
- Tritos NA, Biller BM. 2012. Advances in medical therapies for Cushing's syndrome. *Discov Med*, 13(69):171-179.
- Tsutsumi A, Takano H, Ichikawa K, Kobayashi S, Koike T. 1997. Expression of somatostatin receptor subtype 2 mRNA in human lymphoid cells. *Cell Immunol*, 181(1):44-49.
- Turman MA, Apple CA. 1998. Human proximal tubular epithelial cells express somatostatin: regulation by growth factors and cAMP. *Am J Physiol*, 274(6 Pt 2):F1095-1101.
- Unger N, Serdiuk I, Sheu SY, Walz MK, Schulz S, Saeger W, Schmid KW, Mann K, Petersenn S. 2008. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes in benign and malignant adrenal tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 68(6):850-857.
- van der Hoek J, Waaijers M, van Koetsveld PM, Sprij-Mooij D, Feelders RA, Schmid HA, Schoeffter P, Hoyer D, Cervia D, Taylor JE, Culler MD, Lamberts SW, Hofland LJ. 2005. Distinct functional properties of native somatostatin receptor subtype 5 compared with subtype 2 in the regulation of ACTH release by corticotroph tumor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289(2):E278-287.

- Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Höllt V. 1992. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett*, 311(3):290-294.
- Vikić-Topić S, Raisch KP, Kvols LK, Vuk-Pavlović S. 1995. Expression of somatostatin receptor subtypes in breast carcinoma, carcinoid tumor, and renal cell carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(10):2974-2979.
- Watt HL, Kharmate G, Kumar U. 2008. Biology of somatostatin in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 286(1-2):251-261.
- Wynick D, Polak JM, Bloom SR. 1989. Somatostatin and its analogues in the therapy of gastrointestinal disease. *Pharmacol Ther*, 41(1-2):353-370.

## **9 Anhang**

### **9.1 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. med. habil. A. Lupp, Herr Prof. Dr. med. habil. S. Schulz,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 15.01.2014

Anna Hunder



## 9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Stefan Schulz und Frau PD Dr. med. habil. Amelie Lupp für die Vergabe des Dissertationsthemas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. habil. Amelie Lupp für ihre hervorragende Betreuung. Vielen Dank für die erstklassige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente sowie für die Motivation, die Geduld und das unermüdliche Engagement in der Phase des Schreibens.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft während meiner Tätigkeit im Institut. Im Besonderen möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Falko Nagel, Dr. rer. nat. Christian Doll, Dipl. Biol. Isabell Lenhardt und Frau Heidrun Guder für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Des Weiteren danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer moralisch unterstützt und motiviert haben.